TELMA ALVES MONEZI

IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS GÊNICAS DE *CHELONID*
ALPHAHERPESVIRUS 5 (ChHV5) EM TECIDOS TUMORAIS
CARACTERIZADOS HISTOLOGICAMENTE E SECREÇÕES DE
CHELONIA MYDAS CAPTURADAS NO LITORAL NORTE DO ESTADO
DE SÃO PAULO NO PERÍODO DE 2001 A 2012

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Tecidual
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2016

TELMA ALVES MONEZI

IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS GÊNICAS DE *CHELONID*
ALPHAHERPESVIRUS 5 (ChHV5) EM TECIDOS TUMORAIS
CARACTERIZADOS HISTOLOGICAMENTE E SECREÇÕES DE
CHELONIA MYDAS CAPTURADAS NO LITORAL NORTE DO ESTADO
DE SÃO PAULO NO PERÍODO DE 2001 A 2012

Tese apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e do Desenvolvimento do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Borella

Versão original

São Paulo

2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Monezi, Telma Alves.

Identificação de sequências gênicas de *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5) em tecidos tumorais caracterizados histologicamente e secreções de *Chelonia mydas* capturadas no litoral norte do Estado de São Paulo no período de 2001 a 2012 / Telma Alves Monezi. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Maria Inês Borella.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Estudo etiológico de fibropapilomatose de tartarugas marinhas.

Versão do título para o inglês: Identification of *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5) gene sequences in tumor tissues histologically characterized and secretions from green turtles *Chelonia mydas* captured off the coast of São Paulo State in the period 2001-2012.

1. Herpesvirus 2. ChHV5 3. Fibropapilomatose 4. *Chelonia mydas*
5. Reação em cadeia pela polimerase 6. Análise filogenética I.
Borella, Maria Inês II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0107/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Telma Alves Monezi.

Título da Tese: Identificação de sequências gênicas de *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5) em tecidos tumorais caracterizados histologicamente e secreções de *Chelonia mydas* capturadas no litoral norte do Estado de São Paulo no período de 2001 a 2012.

Orientador(a): Maria Inês Borella.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 045 nas fls. 102 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Dolores Ursula Mehnert**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "Identificação de sequências do herpesvírus *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) em tecidos tumorais de tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas* capturadas em águas brasileiras" do qual participam o(s) alunos **Telma Alves Monezi** e as pesquisadoras **Maria Inês Borella**, **Eliana Reico Matushima**, **Charlotte M. Hársi**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **19.04.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 20 de abril de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26293-1	Data da Emissão: 17/12/2010 19:54
Dados do titular	
Nome: Dotores Ursula Mehnert	CPF: 045.405.328-20
Título do Projeto: Identificação de sequências gênicas do herpesvírus Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus (CFPHV) em tecidos tumorais de tartarugas marinhas da espécie Chelonia mydas capturadas em águas brasileiras	
Nome da Instituição: REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta, processamento e análise de material clínico	01/2011	10/2012

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

- As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
- Esta autorização NÃO exclui o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
- Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
- A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
- O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
- Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
- Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e o uso da infra-estrutura da unidade.
- As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Outras ressalvas

- Essa licença não implica na obrigatoriedade de envio do número de amostras solicitadas no projeto. A coleta das amostras serão realizadas de acordo com a disponibilidade logística da base do TAMAR em Ubatuba-SP. Todos os custos e despesas do projeto serão de responsabilidade do pesquisador.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Elisara Reiko Matuzhima	Pesquisadora	074.600.228-96	6.578.222 SSP/SP-SP	Brasileira
2	Maria Ines Borella	Pesquisadora	053.810.938-61	5066249 SSP-SP	Brasileira
3	Felma Alves Monezi	Pesquisadora	066.462.828-95	134924654 SSP/SP-SP	Brasileira
4	Charlotte Marianne Harsi	Pesquisadora	001.481.158-88	4805013 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		SP	Ubatuba-Projeto Tamar	Fora de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 59275789

Página 1/3

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26293-1		Data da Emissão: 17/12/2010 19:54
Dados do titular		
Nome: Dolores Ursula Mehnert		CPF: 045.405.328-20
Título do Projeto: Identificação de sequências gênicas do herpesvírus Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus (CFPHV) em tecidos tumorais de tartarugas marinhas da espécie Chelonia mydas capturadas em águas brasileiras		
Nome da Instituição: REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO		CNPJ: 63.025.530/0001-04
Atividades X Táxons		
#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Cheloniidae
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Cheloniidae
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Cheloniidae
Material e métodos		
1	Amostras biológicas (Tartarugas marinhas)	Fragmento de tecido/órgão, Sangue
2	Método de captura/coleta (Tartarugas marinhas)	Captura manual
Destino do material biológico coletado		
#	Nome local destino	Tipo Destino
1	REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	Universidade de São Paulo

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 59275789

Página 2/3

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26293-1		Data da Emissão: 17/12/2010 19:54
Dados do titular		
Nome: Dolores Ursula Mehner	CPF: 045.405.328-20	
Título do Projeto: Identificação de sequências gênicas do herpesvírus Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus (CFPHV) em tecidos tumorais de tartarugas marinhas da espécie Chelonia mydas capturadas em águas brasileiras		
Nome da Instituição: REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04	

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Taxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 59275789

Página 3/3

A toda minha família, razão do meu viver!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Profa. Dra. Maria Inês Borella, pela orientação do presente trabalho e por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório. Pela amizade e pelo jeito meigo e doce que sempre me recebeu, muito obrigadal

A Profa. Dra. Dolores Ursula Mehnert, por termos iniciado esse projeto juntas, há anos atrás, e me permitir continuar a desenvolvê-lo em seu laboratório. Pela ajuda, pelos incentivos para realização deste trabalho e pela amizade de todos esses anos.

A minha filha tão amada Ananda Alves Monezi, meu “tudo”, e ao Paulo Monezi que conviveu comigo todos esses anos e que tem se tornado uma pessoa muito melhor. Parabéns!

Aos meus pais queridos e sábios, que me deram a oportunidade de estar aqui e me tornar a pessoa que sou.

AGRADECIMENTOS

Ao Projeto TAMAR-ICMBio, especialmente a Base de Ubatuba (SP), por ter permitido a realização deste trabalho, e ter concedido todas as amostras, desde o início do projeto. Especialmente a Cecília Baptistotte, Berenice M. G. Gallo, José Henrique Becker, Max Rondon Werneck e Renato Velloso. A todos os estagiários e equipe do TAMAR, fundamental para a coleta de dados.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (IBAMA/ICMBio), do Ministério do Meio Ambiente, pela licença concedida para conduzir as pesquisas e trabalhar com esses animais fantásticos e, ainda intrigantes, as tartarugas marinhas.

A FAPESP, pela ajuda financeira concedida nos primeiros anos do estudo com as tartarugas marinhas (2004/13218-5).

A Profa. Dra. Eliana R. Matushima, da FMVZ da USP, por nos ter convidado a participar deste projeto incrível.

Ao Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, IB-USP, pelo Sequenciamento de DNA e, especialmente, a Vanessa Naomi, pela atenção e disponibilidade a mim dispensadas, além das dicas preciosas e “macetes”, fundamentais para os resultados alcançados.

Ao Cruz Alberto Mendoza Rigonati, pelo seu exímio trabalho e por ter me ensinado as técnicas histológicas, que nunca encontraria nos livros e pela oportunidade de convívio no laboratório, tornando nossa convivência muito alegre, obrigada!

A MSc. Elisabeth Mendes Martins de Moura, toda a minha gratidão pelo auxílio concedido em várias etapas desse trabalho, mas principalmente nas etapas iniciais das análises filogenéticas, cuja ajuda foi crucial para que eu persistisse. Por nos tornarmos amigas, compartilhando alegrias, angústias, cafezinhos, lanchinhos e guloseimas.

Ao Prof. Dr. Paolo Zanutto, do Laboratório de Evolução Viral e Bioinformática do Departamento de Microbiologia, por permitir o processamento de dados para as análises filogenéticas nos “poderosos” equipamentos de seu laboratório: e ao Pós-Doc Dr. Caio Freire pela ajuda fundamental e indispensável na análise dos dados que muito contribuíram para a nossa publicação em revista científica, meu muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Enrique Mario Boccardo Pierulivo, do Laboratório de Oncovirologia, do Departamento de Microbiologia, ICB-USP, pelos incentivos constantes para a realização deste trabalho e do paper, e por compartilharmos o café da virologia todas as manhãs, tornando nossos dias mais alegres e descontraídos.

Ao Prof. Dr. Mario Julio A. Campos, então chefe do Depto de Micro, por ter permitido que eu realizasse minha tese no Depto de BioCel.

Ao Prof. Dr. Flavio Alterthum, do Depto de Micro, por sua atenção, generosidade, apoio e incentivos constantes para a realização deste trabalho, além da parceria na autoria de alguns livros e capítulos. Obrigada pelas discussões e dicas preciosas na elaboração da tese. Muito obrigada mesmo!

Aos alunos de Pós-Doc do Departamento de Microbiologia, Dr. Jansen de Araújo e Dra. Angélica Cristine Campos, do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular, pela ajuda e sugestões concedida nas análises filogenéticas para a publicação científica do presente trabalho, fundamental para que se concretizasse.

Ao Dr. Gustavo Dutra, do Aquário de Santos, por ter gentilmente coletado e cedido algumas amostras clínicas dos animais deste estudo.

Ao Prof. Dr. Carlos F. Menck, do Departamento de Microbiologia, ICB-USP, por ter permitido a utilização dos equipamentos de seu laboratório, principalmente para a captação das imagens.

A Natascha M. G. Müller, minha grande amiga, por ter compartilhado comigo muito dos anos iniciais desse projeto, por termos descoberto juntas as aventuras das coletas em Ubatuba, os sacrifícios e maravilhas de trabalhar no laboratório. Amiga, você sabe, é peça fundamental na minha vida!

A Patrícia Garrafa, por tantos anos de convívio no laboratório, amizade, por sempre acreditar em mim e torcer para minha felicidade! Obrigada Paty!

A Dra. Veridiana Munford, por toda ajuda concedida no manuseio do equipamento de fotografia digital, além da amizade de todos esses anos, que não são poucos, conversas, desabafos e parceria em outros trabalhos.

Aos alunos do laboratório, Chayrra, Gisele, Giovana, Marília e Mônica, pela ajuda concedida e troca de experiências, além da amizade, carinho, conversas e risadas compartilhadas nas “festinhas do cardume”.

A Prof^{da}. Dra. Patrícia Gama, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB-USP, por ter permitido meu afastamento da pós-graduação, por motivo de saúde, em momentos cruciais.

Aos Profs. Dr. Sérgio Ferreira de Oliveira e Dr. Fábio Siviero, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB-USP, pela oportunidade de desfrutar a disciplina da primeira turma do curso preparatório para os alunos PAE, que muito contribuiu na minha formação.

A minha terapeuta Margarete Labate, pelo meu equilíbrio emocional, por ter me ajudado a encontrar um “mundo novo” e novas perspectivas, além de ter me ajudado a atravessar um período difícil e que, sem dúvida, não teria conseguido chegar até aqui sem sua ajuda. Meu muito, mas muito, muito, obrigada!

Ao Dr. Hugo Doria, pelas poções mágicas!

Ao meu personal trainner Thiago Garrutti que, durante grande parte do período de execução da tese, cuidou de mim, me arrancou muito suor, além de ter se tornado um amigo. Obrigada pelas manhãs e tardes agitadas!

A todos os alunos do laboratório do Prof. Enrique, da Micro, Bruna, Vanesca, Aline, Suellen, José e Wallason, pelos cafés compartilhados, pela amizade e risadas, fundamentais para manter o equilíbrio.

As secretárias do Departamento, Regina e Celiana, por serem sempre prestativas e terem me atendido com muita gentileza, fundamental em todos os momentos.

As funcionárias da Biblioteca do ICB-USP, Tereza Cristina S. Mayor, Valéria M. L. Pedullo e Maria do Socorro B. Rocha, pela ajuda imensurável na finalização da tese. Pelas dicas preciosas da Tereza e pela gentileza no atendimento e torcidas da Valéria e da Socorro, obrigada meninas!

A minha queridíssima afilhada e sobrinha Renata Alves Prado, pelo seu jeito único de ser, te amo muito!

Aos meus queridos sobrinhos, Giovanna, Luigi, Vinícius, Viriane, Gabriel, Marco Antonio, Larissa, Lucas e Letícia.

A minha irmã maravilhosa Mirian Alves Prado, companheira de todas as horas, que amo muito e ao meu “cunha” Rinaldo que também amo, Ri!

Ao meu irmão querido “Juninho” e a Nilda que admiro muito pela força, coragem e sabedoria, amo os dois!

A Rosa, Cido e todos os agregados, cunhadas e cunhados, amo vocês todos!

*“Somos o que pensamos. Tudo o que somos surge
com nossos pensamentos. Com os nossos
pensamentos, fazemos o nosso mundo.”*

Buda

Resumo

Monezi TA. Identificação de sequências gênicas de *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5) em tecidos tumorais caracterizados histologicamente e secreções de *Chelonia mydas* capturadas no litoral norte do Estado de São Paulo no período de 2001 a 2012 [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2016.

A fibropapilomatose (FP), uma neoplasia benigna caracterizada pela formação de múltiplos tumores que acomete diferentes espécies de tartarugas marinhas e, mais frequentemente, a tartaruga verde (*Chelonia mydas*), é considerada uma das importantes ameaças à sobrevivência dessa espécie. Estudos recentes apontam o *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5) como o provável agente etiológico dessa doença, embora a associação com ambientes antropogenicamente alterados, assim como o estado imunológico desses animais, parecem contribuir para a expressão da doença e a formação dos tumores. No presente estudo, biópsias de tumores e secreções de tartarugas verdes capturadas no litoral do Estado de São Paulo, Brasil, durante o período de dez anos, foram submetidas a análises histológicas e moleculares visando possível detecção e caracterização dos ChHV5 circulantes. Os achados histopatológicos dos tumores de pele revelaram tratar-se de papiloma ou fibropapiloma, apresentando, em 45,5 % dos casos, epiderme proliferativa com degeneração de células epiteliais em formato de *balloning* com característicos corpúsculos de inclusão intranucleares, sugestivos de infecção viral. Os tumores oculares apresentaram evidente hiperplasia epidermal, com elevado número de camadas e três tipos de epitélio, estratificado cornificado, não cornificado e epitélio com diferenciação de células caliciformes. ChHV5 foram detectados pela reação de PCR nas biópsias de pele e olho de animais com e sem FP, assim como em secreções oculares e saliva de animais com FP. A análise das sequências parciais do gene da polimerase do ChHV5 detectadas revelou duas sequências gênicas distintas entre si. A análise filogenética indica que as amostras brasileiras mostraram similaridade com amostras descritas de ChHV5 oriundas do grupo filogeográfico do Atlântico, compartilhando o mesmo ramo que amostras provenientes do Golfo da Guiné e de Porto Rico, sugerindo um possível fluxo dos vírus entre essas regiões.

Palavras-chave: ChHV5. Fibropapilomatose. *Chelonia mydas*. Secreções. PCR. Análise filogenética.

ABSTRACT

Monezi TA. Identification of *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5) gene sequences in tumor tissues histologically characterized and secretions from green turtles *Chelonia mydas* captured off the coast of São Paulo State in the period 2001-2012 [Ph.D. Thesis Tissue and Cellular Biology]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2016.

Fibropapillomatosis (FP), a neoplastic disease characterized by the formation of multiple tumors affecting different species of sea turtles and, most often, the green turtle (*Chelonia mydas*), is considered one of the major threats to the survival of this species. Recent studies indicate that Chelonid herpesvirus (ChHV5) is the etiological agent of this disease, although the association with anthropogenically altered environments and the immune status of these animals also appear to contribute to disease expression and the formation of tumors. In the present study, tumor biopsy and secretions from green turtles captured off the coast of São Paulo State, Brazil, were used in histological and molecular analyses in an attempt to detect and characterize circulating ChHV5. In 45,5 % of cases, histopathological findings of skin tumors revealed focal ballooning degeneration with intranuclear inclusion bodies, results which are suggestive of viral infection. All ocular tumors were papillary with markedly epidermal hyperplasia overlying parakeratotic or orthokeratotic stratum corneum and epithelium with goblet cell differentiation in wide fields. ChHV5 was detected using polymerase chain reaction (PCR) in the animals' skin and ocular tumors biopsies, as well as in their ocular and oral secretions. The analysis of the detected ChHV5 sequences revealed two distinct genetic sequences together. Phylogenetic analysis indicated that Brazilian samples were similar to the ChHV5 samples that have been described for the Atlantic phylogeographic group and therefore are part of the same clade as the Gulf of Guinea and Puerto Rico samples. This similarity suggests a possible flow of the virus between these three regions.

Keywords: ChHV5. Fibropapillomatosis. *Chelonia mydas*. Secretions. PCR. Phylogenetic analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida das tartarugas marinhas. Extraído de Carter, 2007. 24

Figura 2 - Classificação da Família Herpesviridae segundo o Comitê Internacional de Classificação dos Vírus (ICTV), 2015. Todas as espécies dentro dos seus respectivos gêneros, famílias e subfamílias estão descritas. Em destaque o Gênero Scutavirus e a respectiva espécie (em vermelho). 37

Figura 3 - (A) Representação esquemática da partícula viral de herpesvírus, extraído de ; (B-D) Micrografias eletrônicas de herpesvírus. (B) Partículas virais de HSV-1, http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/10235/10235_lores.jpg; (C-D) Partícula viral de ChHV5. Em (C) Vírião brotando da membrana nuclear e em (D) Vírião maduro envelopado dentro do citoplasma, extraído de Herbst et al., (1995). 39

Figura 4 - Mapa do genoma completo de ChHV5, determinado a partir de vetor BAC CH-651-6009. O mapa da cadeia dupla linear mostra as sequências de repetição (TRS e IRS) em marrom, as sequências únicas (US e UL) em cinza e as sequências de fases de leitura aberta (ORFs) em amarelo. A orientação relativa de cada ORF é simbolizada na direção representada pela seta. Extraído de Ackermann et al, (2012). 42

Figura 5 - Distribuição dos variantes A, B, C E D em áreas costeiras ao redor da Flórida. Os vírus foram sequenciados de fibropapilomas de tartarugas provenientes de diferentes locais no mapa. A distribuição dos variantes virais dentro das espécies indicadas está mostrada para cada área. Números mostram quantos indivíduos foram infectados com a respectiva cepa. Extraído de Ene et al., 2005. 44

Figura 6 - Colheita das amostras dos tecidos tumorais dos animais com fibropapilomatose na Base do Projeto TAMAR-ICMBio de Ubatuba/SP. (A,B e C): o animal sobre a mesa em superfície de apoio. (C e D): Anestesia sendo aplicada em tumores selecionados. E: Tumor sendo removido com bisturi. F: Tumores removidos em placas de Petri: inteiro (à direita) e após fragmentação (à esquerda). 56

Figura 7 - Biometria de animais normais coletados no período 2005-2012. Os dados de comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), largura curvilínea da carapaça (LCC) e a respectiva massa corporal (MC), em Kg, de cada animal estão apresentados. 72

Figura 8 - Biometria de animais com fibropapilomatose coletados no período 2005-2012. Os dados de comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), largura curvilínea da carapaça (LCC) e a respectiva massa corporal (MC), em Kg, de cada animal estão apresentados. 73

Figura 9 - Frequência dos tumores encontrados nos animais analisados de acordo com os escores (1-4) observados. 75

Figura 10 - (A-F) Tumores encontrados na pele dos animais acometidos. (A-B) Tumores verrucosos em nadadeiras posteriores. Em (B) notam-se duas massas tumorais de pequena e média dimensões, enegrecida (à direita) e esbranquiçada (à esquerda); (C-E) grandes massas tumorais, enegrecidas, despigmentadas e róseas, em nadadeiras anteriores e pele adjacente. Em D e E, evidente presença de parasitas; (F) Quatro massas tumorais no plastrão, além de ovos de parasitas e tumores nas nadadeiras posteriores e pele adjacente; (G-H) Tumores oculares de dois animais. Em (G) Uma massa tumoral despigmentada partindo da pálpebra superior do olho do animal em direção ao exterior, além de duas massas enegrecidas oculares e grandes massas tumorais partindo do pescoço e nadadeira do animal. (H) Duas massas tumorais verrucosas enegrecidas, de diâmetros desiguais, recobrem parcialmente o olho do animal, o de menor diâmetro parte da junção mucocutânea das pálpebras. Fotografado por Telma A. Monezi. 76

Figura 11 - Pulmão de animal proveniente de Santos, estado de São Paulo, com fibromas de diferentes dimensões distribuídos por todo o órgão. (A) e (B) lado direito e esquerdo do órgão, respectivamente. (C) Maior massa tumoral encontrada apontada por seta. (D) Fibroma mediano sendo removido assepticamente. (E) Áreas do pulmão após remoção de fibromas (setas). (F) Três massas tumorais selecionadas para as análises moleculares sobre placa de petri. Fotografado por Telma A. Monezi e Elizabeth M. Moura. 77

Figura 12 - Frequência de tumores encontrados por região anatômica dos animais analisados. 79

Figura 13 - (A-B) Cortes histológicos de pele de animais sem FP. (A) Epiderme fina e derme e sem alterações (50X); (B) Epiderme com quatro camadas de células e camada reticular subjacente com largos feixes de colágeno evidentes (400X). (C-H) Cortes histológicos de fibropapilomas de tartarugas marinhas. (C) Típica proliferação papilar da epiderme em forma de arborizing (50X); (D) Epiderme hiperplásica com degeneração de células balonizantes (100X); (E) Derme espessa por exacerbada quantidade de tecido conjuntivo (50X); (F) Presença de fibroblastos dispersos na derme espessa; (G) Hiperplasia da epiderme e derme espessa com infiltrações de células na camada reticular (100X); (H) Evidentes feixes de colágeno da derme com infiltrados mononucleares (200X); (I-J) Epiderme hiperplásica com corpúsculos de inclusões, apontados por setas, no interior de células balonizantes, com hiperqueratose nas camadas sobrejacentes à epiderme. Coloração hematoxilina-eosina. 82

Figura 14 - (A-I) Cortes histológicos de fibropapilomas de distintos animais. Evidentes focos de áreas balonizantes circundadas por círculos em menor aumento e as respectivas áreas em aumentos maiores com presença evidente de corpúsculos de inclusão circundados por halo claro no interior dos núcleos das células infectadas. Em (A) Foco de degeneração balonizante à direita do FP arborizante, em (B) na ponta de uma das papilas e em (C) na lateral à direita. Coloração H&E.

83

Figura 15 - (A-F) Áreas com intensa inflamação e ulceração observadas em FP de pele e ocular de animais acometidos. Coloração H&E. (A) Células mononucleares inflamatórias próximas à camada basal epidérmica (seta), além de infiltrados na derme; (B) Pústula evidente no ápice de uma das papilas de tumor ocular, entre a camada mais externa da epiderme e camada hiperqueratótica; (C e D) Intensa infiltração de células mononucleares entre a epiderme e derme (setas), além da presença dessas células dispersas na derme, próximas aos vasos sanguíneos. Em (D) Formação de fendas entre a epiderme e a derme, preenchidas com células inflamatórias (setas). (E) Degeneração das papilas arborizantes com formação de pústulas (setas). (F) À direita, duas extensões papilares com áreas degeneradas e à esquerda, papilas sem degeneração, onde epiderme e derme podem ser distinguidas.

85

Figura 16 - Áreas com infiltração de células mononucleares em tumores de pele (A-D) e oculares (E-F) em cortes ultrafinos (2µm de espessura), corados com H&E. (B-D) Presença de heterófilos distribuídos na derme, apontados por setas. (D) Heterófilos esparsos na derme com grânulos eosinofílicos bem evidentes, apontados por setas. (E) Linfócito, monócito e melanomacrófago apontados por seta preta, branca e ponta de seta, respectivamente. (F) Linfócito apontado por seta.

86

Figura 17 - (A-H) Cortes histológicos de tumores oculares dos animais T10.11 e T17.11. (A e B) Epitélio estratificado com evidente presença de células calciformes apontadas por setas brancas. Presença de estrutura ovalada e acastanhada de possível patógeno, apontado por seta preta branca. (A); (C-D) Epiderme hiperplásica com moderada hiperqueratose paraqueratótica, com núcleo apontado por seta. A seta preta aponta rete peg. E) Inclusão córnea (IC) na derme, apontado por seta; (F) Epiderme hiperplásica com derme espessa subjacente ricamente vascularizada. Presença marcante de rete pegs (setas); (G e H) Elevado número de camadas epiteliais com células apresentando núcleos discarióticos e núcleos circundados por halo claro. Na epiderme hiperplásica notam-se cromatóforos apontados por setas.

88

Figura 18 - Resultados obtidos pela reação de PCR a partir de suspensões tumorais de tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas* coletadas em 2011 na região de Ubatuba/SP. Eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Fragmento específico de 445 pb de CFPHV: amostras 34, 35, 91 a 109, 129 e 175; amostras indeterminadas: 89, 90, 128 e 130; amostras negativas: 131 a 149; L: Padrão de peso molecular, Ladder 100pb (Invitrogen®); C-: Controle negativo.

89

Figura 19 - Resultados obtidos pela reação de PCR (lado esquerdo) e nested-PCR (lado direito). Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de suspensões tumorais de tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas* coletadas em 2011 na região de Ubatuba/SP. Fragmento específico de 445 pb de CFPHV: amostras 55, 57, 103 e 134; fragmento de 206 pb obtidos após reação de nested-PCR: amostras 70, 162 e 84; amostras negativas: 16, 38 e 119; L: Padrão de peso molecular, Ladder 100pb (Invitrogen®); C-: Controle negativo.

89

Figura 20 - (A) Quantificação dos produtos amplificados (445 pb), após reação de PCR, a partir de suspensões tumorais positivas para o ChHV5. ML: Padrão de peso molecular, Low DNA Mass Ladder® (Invitrogen), lado esquerdo da figura. (B) Os valores estimados das concentrações de DNA, em ng/µl, de amostras positivas, após a comparação com o padrão de peso molecular.

91

Figura 21 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos parciais da DNA polimerase de herpesvírus ChHV5 detectadas em *C. mydas* no presente estudo e de amostras provenientes do Genbank, utilizando o programa Ugene versão X. As similaridades existentes estão representadas por pontos em relação à amostra de referência HQ000007 (em destaque), proveniente do Golfo da Guiné (GG), usada para comparação. As substituições de nucleotídeos estão destacadas em caixas coloridas (parte 1).

93

Figura 21 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos parciais da DNA polimerase de herpesvírus ChHV5 detectadas em *C. mydas* no presente estudo e de amostras provenientes do Genbank, utilizando o programa Ugene versão X. As similaridades existentes estão representadas por pontos em relação à amostra de referência HQ000007 (em destaque), proveniente do Golfo da Guiné (GG), usada para comparação. As substituições de nucleotídeos estão destacadas em caixas coloridas (parte 2).

94

Figura 22 - Alinhamento das sequências parciais deduzidas de aminoácidos geradas pelo programa Ugene (versão X). As amostras obtidas foram comparadas entre si e com as amostras de referência do Genbank. As caixas coloridas apresentam todas as substituições dos resíduos de aminoácidos encontradas em relação à amostra de referência HQ000007, proveniente do Golfo da Guiné, em destaque.

98

Figura 23 - Detalhe do alinhamento das sequências parciais deduzidas de aminoácidos de ChHV5, posições 114 a 149, obtidas no presente estudo e de amostras provenientes do Genbank, utilizando o programa Ugene versão X. As amostras foram comparadas entre si. Em destaque a amostra de referência HQ000007, proveniente do Golfo da Guiné (GG), usada para comparação. As substituições dos resíduos de aminoácidos estão destacadas em caixas coloridas. As amostras brasileiras estão envolvidas na caixa. As amostras deste estudo KR048340, KR048341, KR048350 e KR048351 apresentaram o Perfil 1 (P1) e as remanescentes o Perfil 2.

99

Figura 24. Árvore filogenética gerada a partir das sequências de nucleotídeos obtidos que codificam o gene da polimerase dos ChHV5, comparada com as sequências obtidas em diferentes regiões do mundo. Dendograma construído utilizando o programa MEGA. KR048335-59, KT719378-81 e BR SP ICB amostras brasileiras deste estudo. Os quatro grupos filogeográficos estão destacados. Os valores de bootstrap estão destacados em vermelho. Comprimento do ramo indica distância entre as sequências.

100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para a detecção de herpesvírus, seus respectivos produtos amplificados e referências bibliográficas.....	59
Tabela 2. Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados para a detecção dos CFPHV, seus respectivos produtos amplificados e referências bibliográficas.....	62
Tabela 3: Amostras de referência usadas para comparação e para as análises filogenéticas no presente estudo. Os números de depósito do <i>Genbank</i> das amostras e as respectivas procedências, espécies e referências bibliográficas.....	66
Tabela 4. Amostras de pele, saliva, secreção ocular e de tumores de pele, de olho e de pulmão coletados de tartarugas verdes com e sem FP durante o período de 2001-2012 na região sudeste do Brasil.....	69
Tabela 5. Número de tumores encontrados por animal analisado, classificados segundo os escores 1 a 4 (Work e Balazs, 1999): 1) <1 cm; 2) 1cm ≤FP≤ 4cm; 3) 4cm<FP≤10 cm; 4) > 10 cm.....	72
Tabela 6. Número e distribuição de tumores observados, por regiões anatômicas, nos animais com fibropapilomatose analisados e classificados de acordo com os escores padronizados de 1 a 4 (Work e Balazs, 1999).....	76
Tabela 7. Principais características histopatológicas observadas nas biópsias de pele e oculares de animais com e sem fibropapilomatose, em pelo menos um do total de cortes histológicos examinados de cada animal, coletadas em 2011 e 2012 no litoral norte do estado de São Paulo.....	78
Tabela 8. Frequência relativa das principais características histopatológicas observadas nas biópsias de pele e oculares de animais com e sem fibropapilomatose do presente estudo.....	79
Tabela 9. Número total de amostras processadas pela reação de PCR, nested-PCR e submetidas à reação de sequenciamento gênico do período 2001-2012.....	88
Tabela 10. Tabela 10 - Amostras de tumores, secreção ocular e saliva, provenientes de animais coletados no período 2001-2011, com seus respectivos registros, submetidas à reação de sequenciamento gênico e caracterizadas pela análise filogenética.....	90
Tabela 11. Tabela de porcentagem de identidade (acima da diagonal) e distância (abaixo da diagonal) entre as sequências nucleotídicas do gene da polimerase (445 nt) obtidos nesse estudo e os descritos no Genbank. As amostras destacadas em vermelho e azul são amostras provenientes do Brasil, as primeiras referem-se às amostras do presente estudo (Perfil 1, 2) e as últimas são provenientes de estudo prévio (Rodenbusch et. al, 2014), respectivamente.....	92
Tabela 12. Resultados globais obtidos no presente estudo após as análises histológicas e moleculares de amostras obtidas de tartarugas marinhas provenientes do sudeste do Brasil no período de dez anos.....	93

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Tartarugas marinhas	22
1.2 Ameaças às tartarugas marinhas	24
1.3 Fibropapilomatose: a doença	26
1.4 Características histológicas dos tecidos tumorais	27
1.5 Epidemiologia da fibropapilomatose	28
1.5.1 Prevalência	28
1.6 Etiologia	30
1.7 Patogenia	31
1.8 Curso clínico da doença	34
1.9 Características gerais dos herpesvírus	35
1.9.1 Classificação	35
1.9.2 Propriedades gerais dos herpesvírus	38
1.9.2.1 Estrutura viral	38
1.9.2.2 Organização do genoma	40
1.10 Epidemiologia dos ChHV5	43
1.11 Análises filogenéticas do ChHV5	46
1.12 Evolução dos ChHV5	46
1.13 Possíveis vias de transmissão viral	47
1.14 Fatores ambientais	48
2 OBJETIVOS	51
2.1 Gerais	52
2.2 Específicos	52
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 Animais e método de manejo	54
3.2 Vírus Padrões	54
3.3 Amostras clínicas	54
3.3.1 Obtenção do material clínico	55
3.3.2 Coleta de dados biométricos	55
3.3.2 Remoções cirúrgicas dos tumores	56
3.3.3 Colheita de secreções	57
3.4 Cultura celular	57
3.4.1 Sistema celular utilizado	57
3.4.2 Método de cultivo	57
3.4.3 Cultivo do vírus padrão HSV-1	58
3.5 Processamento dos materiais	58
3.5.1 Fixação dos tecidos tumorais	58
3.5.2 Suspensões dos tecidos tumorais para análises moleculares	59
3.6 Métodos de detecção viral	59
3.6.1 Análise dos cortes histológicos por microscopia de luz	59
3.6.2 Detecção viral por métodos moleculares	59
3.6.2.1 Extração de DNA viral dos lisados tumorais e das secreções	59
3.6.2.1.1 Utilizando o reagente Trizol	59
3.6.2.1.2 Utilizando o Kit comercial Dneasy Blood & Tissue	60
3.6.2.2 Detecção de Herpesvírus	61
3.6.2.2.1 Reação de PCR	62
3.6.2.2.2 Reação de Nested-PCR	62
3.6.2.3 Detecção dos herpesvírus de quelônio Tipo 5 (ChHV5)	63
3.6.2.3.1 Reação de PCR	63
3.6.2.3.2 Reação de Nested-PCR	65
3.6.2.4 Sequenciamento gênico	65
3.6.2.4.1 Extração do DNA para o sequenciamento	65
3.6.2.4.2 Reação de Sequenciamento	66
3.6.2.4.3 Edição e análise das reações do sequenciamento	67
3.6.2.4.4 Reconstruções filogenéticas	67

4 RESULTADOS	69
4.1 Caracterização das amostras obtidas	71
4.2 Biometria dos animais	72
4.3 Análise dos tumores	73
4.4 Métodos de detecção viral	75
4.4.1 Análise histológica	75
4.4.1.1 Amostras obtidas	75
4.4.1.2 Distribuição dos tumores	78
4.4.1.3 Análise dos cortes histológicos por microscopia de luz	79
<i>4.4.1.3.1 Pele Normal</i>	81
<i>4.4.1.3.2 Características comuns aos tumores de pele e oculares</i>	81
<i>4.4.1.3.3 Tumores oculares</i>	87
4.4.2 Detecção viral por métodos moleculares	88
4.4.2.1 Reação de amplificação gênica em cadeia pela polimerase (PCR/nPCR)	88
4.4.2.2 Sequenciamento gênico	90
<i>4.4.2.2.1 Quantificação de DNA para o sequenciamento</i>	90
<i>4.4.2.2.2 Reação de sequenciamento</i>	91
<i>4.4.2.2.2.1 Sequências de nucleotídeos</i>	92
<i>4.4.2.2.2.2 Sequências de aminoácidos</i>	97
4.4.3 Análise filogenética	100
4.5 Resultados gerais	101
4.6 Publicação científica	103
5 DISCUSSÃO	104
6 CONCLUSÃO	117
7 REFERÊNCIAS*	121
ANEXO A	133
ANEXO B	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CII: corpúsculo de inclusão intranuclear
ChHV5: Chelonid alphaherpesvirus 5
cm: centímetro
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (N: A, C, G ou T)
dsRNA: *double strand* (dupla fita) de RNA
ECP: Efeito Citopático
EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético
ECP: efeito citopático
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
FP: Fibropapilomatose
g: aceleração da gravidade
HE: Hematoxilina Eosina
ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses (*Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus*)
Kb: Kilo base
m: metro
MEM: Meio Mínimo Essencial
M: Molar
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
Min. : Minuto
mM: Milimolar
mm: Micrômetro
MME: Meio Mínimo Essencial
ORF: *Open reading frames*
μL: Microlitro
mm : milímetro
μm: micrometro
nm: nanometro
M: molar ou mol
mM: milimolar ou milimol
μM: micromolar ou micromol
pM: picomolar ou picomol
kg: quilograma
mg: miligrama
μg: micrograma
ng: nanograma
l: litro
ml: mililitro
μl: microlitro
kb: quilobase
ORF: *open reading frames*
pb: pares de base
PBS: Solução Salina Fosfatada
PCR: *polymerase chain reaction*
pmoles: picomoles
RNA: Ácido ribonucleico
rpm: rotação por minuto
SFB: Soro Fetal Bovino
TAE: Tampão contendo Tris, Ácido Acético e EDTA
rpm: rotação por minuto
TBE: Tampão Tris-Borato
Tth: DNA polimerase (*Thermus thermophilus*)
U: Unidade
V/V: volume a volume
UV: Ultravioleta

1.1 Tartarugas marinhas

As tartarugas marinhas estão classificadas na Ordem Testudines onde também estão incluídas as tartarugas terrestres e de água doce, na Subordem Cryptodira e nas famílias *Cheloniidae* e *Dermochelyidae*. A família *Cheloniidae* inclui seis espécies de tartarugas marinhas, com carapaça coberta por placas. A família *Dermochelyidae* inclui somente a tartaruga de couro que, possui pele semelhante a couro ao invés de carapaça coberta por placas.

No Brasil, existem cinco espécies de tartarugas marinhas que utilizam áreas costeiras e ilhas para alimentação e sítios de desova: *Chelonia mydas* (tartaruga-verde), *Caretta caretta* (tartaruga-cabeçuda), *Lepidochelys olivacea* (oliva), *Eretmochelys imbricata* (tartaruga-de-pente) e *Dermochelys coriacea* (tartaruga-de-couro).

A espécie *Chelonia mydas*, popularmente denominada tartaruga verde ou aruanã, possui distribuição global, desde os trópicos até as zonas temperadas, sendo a espécie de tartaruga marinha que apresenta hábitos mais costeiros, utilizando inclusive estuários de rios e lagos (Hirt, 1997). É um animal tipicamente solitário, das mais tropicais dentre as tartarugas marinhas, que podem ocasionalmente ser encontradas em agregações em locais de alimentação, com águas rasas e abundância de algas (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 1990).

Com relação aos hábitos alimentares, são onívoros nos primeiros anos de vida, com tendência carnívora, e depois adotam dieta exclusivamente herbívora (Almeida, 2011; Bjørndal, 1997). Alimentam-se de uma variedade de plantas aquáticas e algas marinhas, além de águas-vivas, salpas e esponjas e, no Pacífico, são vistas predando moluscos, peixes, poliquetas e águas-vivas (Spotila, 2004). No sudeste do Brasil, dez espécies de algas pardas do grupo *Rhodophyta*, além de plantas aquáticas, foram recuperadas do estômago de tartarugas mortas em um estudo para avaliar a qualidade ambiental da região (dos Santos et al., 2011).

A maturidade sexual das tartarugas verdes é atingida mais tarde que as demais espécies de tartarugas marinhas, devido ao crescimento mais lento em função da dieta herbívora. Em média, estão aptas para a reprodução entre 25 e 50 anos (Chaloupka et al., 2004).

São animais altamente migratórios, possuindo um ciclo de vida longo e complexo (Figura 1) sendo assim, a história natural da tartaruga verde é muito difícil de ser estudada por causa dessas longas escalas de tempo e espaço envolvidos.

Usam e/ou permanecem em diferentes ambientes ao longo da vida, o que implica mudança de hábitos. Embora sejam marinhas, utilizam o ambiente terrestre (a praia) para desova, garantindo o local adequado à incubação dos ovos e o nascimento dos filhotes (<http://www.projetotamar.org.br>, Projeto TAMAR-ICMBio).

Determinar onde as tartarugas marinhas passam seus primeiros anos de vida tem sido um problema fundamental da ecologia das tartarugas marinhas durante décadas (Carr, 1980; Mansfield, Putman, 2013; Reich et al., 2007). Após a eclosão dos ovos, os filhotes realizam uma deriva passiva ocasionada pelas correntes marítimas, onde normalmente estão associados a mantos de algas *Sargassum*, e, posteriormente, iniciam uma fase pelágica que pode durar vários anos (Meylan et al., 2000). Esses primeiros anos de suas vidas são denominados como “anos perdidos”, exatamente pela dificuldade de saber, com precisão, o que naturalmente ocorre com elas (Naro, Putman, 2013). Nessa fase pelágica do ciclo de vida, geralmente apresentam até cerca de 20 a 30 cm de comprimento retilíneo da carapaça (Meylan et al., 2000).

Os recém-eclodidos e jovens movem-se entre habitats de alimentação durante o desenvolvimento e os adultos migram entre locais de alimentação e reprodução, portanto seus movimentos são difíceis de serem acompanhados em ambiente marinho (Bowen et al., 1992). As fêmeas migram das áreas de alimentação e descanso para as áreas de reprodução, em deslocamentos que podem chegar a mais de 1500 km (Almeida, 2011).

Há propostas do conceito de “habitats de desenvolvimento”, zonas nas quais são encontradas as tartarugas imaturas. Nessa fase, as tartarugas juvenis recrutam para áreas de alimentação costeiras, conhecidos como habitats de forrageamento, onde permanecem por vários anos, 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 certa residência nesses locais por um período de tempo (Almeida, 2011; Meylan, 2000).

Indivíduos maduros movem-se periodicamente de baías neríticas às praias de nidificação e áreas de acasalamento, muitas vezes separadas por centenas de milhares de quilômetros (Arthur et al., 2008; Bowen, Karl, 2007; Bowen et al., 2007; Casale et al., 2008; Plotkin et al., 1995). Adultos retornam à sua região de origem para o acasalamento e nidificação, enquanto tartarugas imaturas normalmente formam agregações de indivíduos perto da costa e de várias colônias de nidificação (Bowen, Karl, 2007), Figura 1.

Figura 1 - Ciclo de vida das tartarugas marinhas. Extraído de <http://www.cancunturtles.com/info/sea-turtle-life-cycle>. 1. Os filhotes recém-nascidos nadam para mar aberto, onde permanecem nos primeiros anos de vida; 3. Migração durante o desenvolvimento, são os chamados "anos perdidos". Ambiente pelágico. 4. Machos e fêmeas retornam para áreas de alimentação. Áreas de alimentação costeiras. 5. Indivíduos imaturos/adultos. 6. Fêmeas retornam para áreas costeiras para acasalamento. 7. Acasalamento. 8. Nidificação. 9. Fêmeas retornam para áreas costeiras.

No Brasil, uma das mais importantes áreas de alimentação e refúgio das tartarugas marinhas encontra-se na região de Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo, ao lado de Fernando de Noronha e Praia do Forte (Projeto TAMAR-ICMBio). O litoral norte do Estado de São Paulo é caracterizado por grande número de pequenas praias intercaladas por amplos costões rochosos (Gallo et al., 2000). As ilhas marinhas da região são utilizadas por tartarugas marinhas, especialmente as tartarugas verdes, como áreas de pastoreio (FAO, 1990; Sazima, 1983).

As desovas das tartarugas verdes, no Brasil, ocorrem principalmente nas ilhas oceânicas, Ilha da Trindade (ES), Atol das Rocas (RN) e Fernando de Noronha (PE). Na costa brasileira, áreas de desova secundárias ocorrem no litoral norte do estado da Bahia. Esporadicamente, ninhos também ocorrem nos estados do Espírito Santo, Sergipe e Rio Grande do Norte. Ocorrências não reprodutivas são registradas em toda a costa do Brasil e também nas ilhas (Almeida, 2011).

1.2 Ameaças às tartarugas marinhas

As tartarugas marinhas são animais que sofrem uma série de ameaças que vão desde a ingestão de lixo marinho; emaranhamento em redes e linhas de pesca; destruição de habitats; urbanização e poluição de habitats de nidificação e áreas de alimentação, tais como iluminação, trânsito de veículos, pessoas e obstáculos; depredação por animais selvagens e domésticos; caça tradicional; consumo e uso de carapaça, carne e ovos; como também sofrem os impactos das alterações climáticas

sobre o ambiente marinho e terrestre (Bjorndal, 1995; Herbst, Klein 1995; Lutz, 2002; Mast et al., 2005; Van Houtan et al., 2010). A captura contínua de tartarugas juvenis e adultas é uma das mais sérias ameaças, causando um declínio devastador dessas populações (Marcovaldi, 2000). Segundo Chaloupka et al., (2008), muitas populações de tartarugas verdes têm sido esgotadas pela exploração, indicando que esses animais possam estar globalmente em perigo.

Atualmente, a tartaruga marinha *Chelonia mydas* é considerada **espécie em perigo** pelo grupo de especialistas em tartarugas marinhas IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) – *The IUCN Marine Turtle Specialist Group* (IUCN, 2011). Também é considerada como **ameaçada de extinção**, no Livro Vermelho da Fauna Brasileira (Martins, Molina, 2008), e como **vulnerável** segundo a Avaliação do Estado de Conservação de Tartarugas Marinhas no Brasil (ICMBio) (Almeida, 2011).

Cada vez mais, estudos, pesquisas e esforços de conservação estão sendo desenvolvidos no sentido de diminuir as ameaças e tem ajudado na recuperação de algumas das principais populações de tartarugas verdes (Chaloupka et al., 2008).

No Brasil, uma das principais instituições responsáveis pela conservação e pesquisa das tartarugas marinhas é o Projeto TAMAR, que foi criado em 1980 e, desde então, participa ativamente na luta para a preservação desses animais. Institucionalmente, está ligado ao Instituto Chico Mendes da Biodiversidade-ICMBio, do Ministério do Meio Ambiente e é co-administrado pela Fundação Pró-Tamar. Sua missão é conhecer, recuperar e proteger as populações das cinco espécies de tartaruga marinha que ocorrem no Brasil. Monitora áreas de desova e de alimentação desses animais, no litoral e em áreas oceânicas. Para isso, mantém bases de pesquisa na Bahia, Sergipe, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (Projeto TAMAR–ICMBio).

Cabe salientar que, apesar dos esforços das instituições e de indivíduos, no Brasil e no mundo, surtos de doenças também estão contribuindo para a morbidade e mortalidade de *C. mydas*, já vulneráveis (Chaloupka et al., 2008; Flint et al., 2010; Foley et al., 2005). Entre as doenças está a fibropapilomatose (FP), objeto do presente estudo, que é considerada uma das mais importantes ameaças à sobrevivência das tartarugas verdes e, nos últimos anos, tem sido relatada em todas as espécies de tartarugas marinhas (Balazs, Work; 1997; Huerta et al., 2002).

1.3 Fibropapilomatose: a doença

A fibropapilomatose, uma doença neoplásica debilitante que acomete tartarugas marinhas principalmente da espécie *Chelonia mydas*, caracterizada pela formação de tumores cutâneos, oculares e viscerais, representa uma importante ameaça à sobrevivência dos animais afetados em meio natural, uma vez que pode provocar emaciação, inabilidade de natação e locomoção, impedindo a apreensão de alimentos, dificultando a visão, podendo provocar inclusive falência de órgãos (Balazs 1986; Herbst 1994; Jacobson et al., 1989; Quackenbush et al., 1998; Smith, Coates, 1938).

A etiologia primária da doença é atribuída ao herpesvírus de quelônios *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5), porém há um consenso de que a associação desses vírus com ambientes antropogenicamente alterados possam contribuir para a transmissibilidade dos vírus e/ou expressão da doença, assim como, com formação de tumores, já que uma alta prevalência de FP é comum nestes locais (Aguirre, Lutz, 2004; Chaloupka et al., 2008).

Os fibropapilomas são tumores benignos que podem passar de 30 cm de diâmetro (Lackovich et al., 1999) e que envolvem o tegumento, podendo estar presentes em nadadeiras, olhos, base da cauda, casco e regiões oral, cervical, inguinal e axilar (Herbst, 1994; Jacobson et al., 1989). Os tumores oculares variam de 2 a 4 cm de diâmetro podendo obstruir completamente a visão (Brooks et al., 1994; Jacobson et al., 1989), enquanto os tumores orais podem obstruir a glote, levando os animais acometidos à morte (Balazs et al., 1998). Os tumores cutâneos possuem textura lisa a verrucosa, podem ser sésseis ou pedunculados, e as maiores formações podem estar ulceradas e necróticas (Jacobson, 1989). Embora a ocorrência dos tumores oculares seja frequente, a descrição e caracterização ainda são escassas na literatura mundial e apenas restritas a algumas regiões globais (Brooks et al., 1994; Flint et al., 2010).

Nódulos viscerais têm sido relatados em *C. mydas* com FP, podendo acometer pulmão, coração, trato gastrointestinal, fígado e rim (Herbst, 1994; Norton et al., 1990; Work et al., 2004;). Macroscopicamente, os nódulos internos são caracterizados por numerosas massas esféricas ou múltiplos nódulos brancos firmes, lisos, discretos ou não, ou, ainda, podem ser gelatinosos e translúcidos. Os tumores viscerais encontrados em animais acometidos variaram de 0,1 a 4 cm de diâmetro (Herbst, 1994; Norton et al., 1990). Em Porto Rico, 41% (7/17) de tartarugas verdes com

fibropapilomatose apresentaram nódulos em pulmão e fígado que variaram de 0,1 a >20 cm de diâmetro (Williams et al., 1994).

Considerando-se a possibilidade de etiologia infecciosa da FP, opina-se que tais tumores internos sejam consequência de septicemia (Balazs, 1997; Jacobson et al., 1991; Norton et al., 1990; Work et al., 2004).

1.4 Características histológicas dos tecidos tumorais

Histologicamente, os tumores de pele podem ser classificados como papilomas, fibropapilomas e fibromas dependendo do grau de proliferação da epiderme e da derme. Os papilomas apresentam principalmente epiderme proliferativa, enquanto os fibromas intensa proliferação da derme com feixes de colágeno maduro, sugerindo tratar-se de estágio inicial ou mais crônico da doença, respectivamente. Os fibropapilomas representam uma lesão intermediária, são caracterizados por projeção papilar e marcante hiperplasia da epiderme, proliferação de fibroblastos em vários estágios de diferenciação e presença de feixes de fibras de colágeno na derme (Herbst, 1994; Herbst et al., 1999; Jacobson et al., 1989). As células do estrato espinhoso e de camadas mais externas da epiderme apresentam-se hipertróficas e com vacúolos citoplasmáticos, podendo apresentar células com degeneração balonizante, contendo inclusões intranucleares eosinofílicas ou basofílicas sugestivas de infecção viral (Greenblatt et al., 2005; Herbst, 1994; Jacobson, 1991; Lackovich, 1999).

Os tumores viscerais são classificados histologicamente como mixofibromas, fibromas ou fibrossarcomas de baixo grau de malignidade. Geralmente os nódulos estão embutidos dentro do parênquima do tecido, mas podem, muitas vezes, surgir a partir de uma protuberância da superfície podendo, até mesmo, ser pedunculados (Herbst, 1994; Herbst et al., 1999). A maioria dos nódulos viscerais parece ser bem demarcada do tecido circundante, mas alguns podem ter bordas irregulares, sugerindo infiltração do estroma circundante, particularmente no rim, onde existe uma grande quantidade de estroma fibroso (Herbst, 1994; Herbst et al., 1999).

Os órgãos mais comumente afetados em uma amostragem de 13 tartarugas verdes com massas cutâneas e viscerais foram pulmão (77%), rim (69%), coração (38%), trato gastrointestinal (31%) e fígado (23%) (Herbst, 1994). Em outro estudo, Work et al., (2004) encontraram 39% de tartarugas verdes com tumores internos, do total de 255 animais necropsiados, a maior parte deles no pulmão, rim e coração.

Fibromas predominaram nos pulmões, rins e músculo esquelético enquanto mixofibromas foram mais comuns no intestino e baço. Fibrosarcomas de baixo grau de malignidade foram mais frequentes no coração, com predileção pelo átrio direito.

A característica histológica comum encontrada em tumores viscerais é a extensa proliferação de fibroblastos com algumas figuras mitóticas. Nos tumores precoces, pode ocorrer secreção abundante de substância fundamental mixomatosa e, em tumores mais maduros, deposição de fibras finas de colágeno. Fibrose extensiva e fibroplasia intersticiais foram vistos nos pulmões, rim, no fígado, no estômago e no coração (Herbst et al., 1999).

Dependendo do órgão acometido, diferentes características histopatológicas foram observadas. Fibrossarcomas de baixo grau malignidade foram caracterizados por pequenos agregados de colágeno densos misturados com numerosos fibroblastos sobrepostos por epitélio colunar ciliado hipertrofiado, podendo se infiltrar no miocárdio adjacente causando atrofia ou necrose de miofibras com graus variados de severidade (Herbst et al., 1999; Work et al., 2004). Em tumores grandes de pulmão, geralmente o epitélio encontrado era hiperplásico, podendo conter cistos de vários tamanhos alinhados por epitélio colunar ciliado, com presença marcante de colágeno no centro do tumor desenvolvido e menor quantidade de células. Em tumores renais foram observados deslocamento de interstício e atrofia de túbulos renais. Fibromas do intestino delgado apresentaram numerosos fibroblastos em uma matriz colagenosa densa e fibroblastos sobrepostos pela mucosa escamosa projetando prolongamentos (*rete pegs*) proeminentes com pérolas de queratina ocasionais na matriz de colágeno.

Mixofibromas geralmente tinham uma matriz mais solta com menor quantidade de células misturadas com proteoglicano (Herbst et al., 1999; Work et al., 2004).

1.5 Epidemiologia da fibropapilomatose

1.5.1 Prevalência

A ocorrência de fibropapilomas já havia sido reportada há cerca de 80 anos por Luckes (1938) e Smith e Coates (1938) nas tartarugas das águas costeiras dos EUA e vem sendo relatada com frequência crescente, acometendo todas as espécies de tartarugas marinhas, chegando a proporções de uma epizootia (Foley et al., 2005; Chaloupka et al., 2008) e, após alcançar várias regiões geográficas a nível mundial, é considerada uma panzootia (Williams et al., 1994).

A fibropapilomatose é uma doença de distribuição global e, dependendo da região analisada, a prevalência pode variar de 0 a 92%. Estudos provenientes de

distintas regiões relatam a ocorrência da FP entre 0 a 72,5% na Flórida (Ehrhart 1991; Lackovich et al., 1999), de 1 a 92% no Havaí (Balazs, 1991), de 0 a 70% na Austrália (Aguirre et al., 1999; Limpus, Miller, 1994), em média 21,5% na Indonésia (Adnyana et al., 1997) e 17% na África (Formia et al., 2007). No arquipélago havaiano, após o surto no final dos anos 1980, seguido de um pico em meados da década de 1990, verificou-se um declínio na prevalência da doença, chegando ao redor de 9,4% em 2007 (Chaloupka et al., 2009).

Em estudo recente sobre a fibropapilomatose, Jones et al., (2016) apresenta detalhadamente a prevalência da FP, em diferentes regiões no mundo e em espécies distintas de tartarugas marinhas, descrita por diversos autores em determinados períodos de amostragem.

No Brasil, o primeiro registro da FP foi em 1986 na região do Espírito Santo e a prevalência da doença no país também varia de acordo com a região analisada. O primeiro registro da FP foi em 1986 na região do Espírito Santo. Em 2001, Baptistotte et al., relataram prevalência de 0 a 24% no período de 1986 a 1998. No período de 2000 a 2005, outro estudo visando a caracterização espacial e temporal da fibropapilomatose, após análise de 10.170 animais acometidos, revelou uma ocorrência de 5,96% no Rio de Janeiro; 10,73 % em São Paulo; 15,81% na Bahia; 18,46% em Sergipe; 27,43% no Espírito Santo, 31,43% na região costeira do Rio Grande do Norte e 36,94% no Ceará. A prevalência da média nacional para a espécie *Chelonia mydas* foi de 15,41% nesse mesmo período. Das cinco espécies presentes na costa brasileira, apenas as tartarugas da espécie *Dermochelys coriacea* não apresentaram tumores (Baptistotte, 2007).

Entretanto, existem outras áreas do país sem nenhum caso descrito até hoje como, por exemplo, as ilhas oceânicas do Atol das Rocas (RN), Ilha da Trindade (ES) e o Arquipélago de Fernando de Noronha (PE) (Baptistotte, 2007; Rossi, 2014).

Em estudo mais recente (Rossi, 2014), do total de tartarugas capturadas no período de 2010 a 2013, em cinco regiões brasileiras, 42,11% (56/133) apresentaram FP. Os índices de prevalência por região variaram de 0% em Fernando de Noronha (PE) e 0% em Florianópolis (SC) seguido por 25% em Almofala (CE), 42,9% em Ubatuba (SP) e 48% em Vitória (ES) (Baptistotte, 2007).

Existem evidências de que a ocorrência seja maior em regiões onde há pressão populacional através de atividade industrial, agrícola e urbana e em ambientes próximos às praias, baías e lagos (Adnyana et al., 1997; Balazs, 1991).

1.6 Etiologia

Até o final da década de 1990, a etiologia da FP ainda era desconhecida, mas muitas hipóteses estavam sendo consideradas como a origem infecciosa, por ação ou reação a fatores ambientais e a predisposição genética dos animais. Porém, estudos mais recentes sugeriram que a FP estava associada à infecção por um herpesvírus (Herbst et al., 1995; Lackovich et al., 1999; Quackenbush et al., 1998, 2001).

Algumas fortes evidências levaram a especulação de que a FP fosse causada por um agente infeccioso, mais especificamente um vírus: a natureza epizootica da doença, o súbito aparecimento da doença em novas localizações, a variação da prevalência entre locais muito próximos e a observação de que alguns animais se recuperam da doença.

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). A princípio, alguns vírus foram propostos como candidatos potenciais a agentes etiológicos da FP em tartarugas marinhas: o vírus do papiloma (Herbst, 1994), vírus *papova-like* (Lu et al., 2000), retrovírus (Casey et al., 1997) e herpesvírus (Herbst, 1994; Herbst et al., 2004; Jacobson et al., 1991; Quackenbush et al., 1998).

Jacobson et al., (1991) analisaram tecidos tumorais de duas *C. mydas* pelos métodos de microscopia óptica e eletrônica. A avaliação histopatológica revelou áreas de degeneração balonizante nas células da epiderme com corpúsculos de inclusão intranucleares sugestivos da presença de vírus. Partículas virais imaturas e envelopadas, com tamanhos de 77-90 nm e 110-120 nm, foram visualizadas por microscopia eletrônica nessas inclusões intranucleares e em áreas adjacentes do citoplasma, respectivamente, sendo consistentes no tamanho, localização e morfogênese com membros da família *Herpesviridae*.

Outros estudos, baseados em técnica de PCR, apontaram os herpesvírus na patogenia e na etiologia da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* e *Caretta caretta* (Lackovich et al., 1999; Quackenbush et al., 1998, 1999).

A partir de 1998, estudos subsequentes baseados em análises das sequências gênicas obtidas de tumores provenientes de animais da Flórida e do Havaí, apontaram um novo alfaherpesvírus como o provável agente etiológico da fibropapilomatose (Ene et al., 2005; Greenblatt et al., 2005; Herbst et al., 2008; Quackenbush et al., 1998;

Work et al., 2009; Yu et al., 2001), demonstrando uma forte associação entre a doença e os herpesvírus e sugerindo, portanto, uma relação de causa e efeito.

Apesar da presença dos herpesvírus em tecidos tumorais ter sido demonstrada, o cultivo desses vírus *in vitro*, até o momento, não teve sucesso, mesmo após algumas tentativas de isolamento usando células de tartarugas verdes e métodos clássicos de culturas celulares (Lu et al., 1999; Moore et al., 1997). Portanto, os postulados de Koch não foram cumpridos completamente, prejudicando, assim, as tentativas de compreender melhor a patogênese viral.

Cabe ressaltar, entretanto, que embora os estudos moleculares apontem o *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5) como o provável agente etiológico primário da fibropapilomatose, há um consenso de que a etiologia da FP está associada a vários fatores concorrentes. A interação multifatorial entre uma variedade de fatores, discutido mais adiante, provavelmente, também contribui para o estabelecimento e o desenvolvimento da doença.

1.7 Patogenia

Alguns estudos histológicos descreveram as principais lesões encontradas nos tecidos de animais com FP e levantaram, em parte, o envolvimento com o provável agente etiológico da doença.

O estudo pioneiro que forneceu a evidência de que a FP está associada a um agente infeccioso, mais precisamente um vírus, foi realizado por Herbst et al. (1995). Estes pesquisadores demonstraram que os tumores podem ser transmitidos para animais não acometidos através da inoculação de homogenados de fibropapilomas livres de células, fato compatível com a presença de um agente infeccioso. Fibropapilomas foram induzidos em doze tartarugas verdes juvenis, mantidas em cativeiro, com extratos preparados de fibropapilomas coletados a partir de doadores (3/4) com doença espontânea e foram detectados, pela primeira vez, entre 15 e 43 semanas após a inoculação. Os traços histológicos das lesões induzidas foram consistentes com os fibropapilomas espontâneos de *C. mydas*. Além disso, 72% (10/11) dos animais apresentaram focos de degeneração balonizante na camada espinhosa da epiderme de 24 tumores, alguns deles contendo corpúsculos de inclusão intranucleares, enquanto outros, a maioria das células tinham núcleos picnóticos. Essas áreas focais continham partículas de *herpesvirus-like* (Figura 3C,D), variando de 80 a 90 nm de diâmetro, em vários estágios de montagem, e partículas maduras envelopadas no citoplasma, medindo entre 110 a 125 nm, compatíveis em tamanho e

morfologia com as descrições de estudo anterior (Jacobson et al., 1991). Ovos de trematódeos não foram visualizados em nenhum corte histológico, descartando assim, a possibilidade do envolvimento desses agentes na formação dos tumores.

O primeiro estudo de comparação entre tumores espontâneos em tartarugas de vida livre com tumores induzidos experimentalmente foi realizado quatro anos depois (Herbst et al., 1999). Com o objetivo de diferenciar as características histológicas que resultam da patogenia da FP e aquelas que resultam de fatores incidentais que podem variar de acordo com a região geográfica, Herbst et al., (1999) analisaram amostras de biópsias de três grupos de tartarugas verdes: com tumores espontâneos, provenientes de animais da Flórida (grupo 1) e de Havaí (grupo 2), e amostras de tumores induzidos experimentalmente em tartarugas verdes criadas em cativeiro (grupo 3).

As características histológicas comuns encontradas nos tumores espontâneos e nos tumores induzidos experimentalmente incluiu a proliferação de fibroblastos em derme superficial; acantose da epiderme; hiperqueratose; degeneração de células basais da epiderme, com formação de fenda entre derme e epiderme; degeneração da camada espinhosa, com vesícula intraepidérmica e formação de pústulas e ulceração (Herbst et al., 1999). Com exceção da primeira característica descrita, encontrada em 100% dos três grupos analisados, a frequência relativa variou entre os três grupos analisados (Herbst et al., 1999).

Os tumores viscerais, encontrados em oito de 10 (80%) tartarugas de vida livre com doença cutânea, que foram examinadas após a morte, nesse mesmo estudo, tiveram extensa proliferação fibrosa intersticial. Além disso, a presença de ovos de trematódeos e granulomas de corpo estranho associados foram encontradas somente nos tumores espontâneos e variaram conforme a localização geográfica, sugerindo que estes são achados incidentais (Herbst et al., 1999).

Inclusões intranucleares eosinofílicas e antígenos intranucleares de herpesvírus foram encontrados em 18 dos 38 (47%) tumores cutâneos induzidos experimentalmente e em nove dos 119 (7,5%) tumores espontâneos apenas nas tartarugas verdes da Flórida. A maior frequência das inclusões intranucleares detectada pelos métodos de HE e imuno-histoquímica foi encontrada nos tumores mais jovens induzidos, sugerindo que, se a produção de vírus e o derramamento viral são eventos transitórios precoces na progressão da doença, a evidência de infecção ativa diminuirá em tumores mais velhos e maiores (Herbst et al., 1999).

Câncer em seres humanos e animais podem ser causados por vírus, mas os tumores induzidos por vírus são considerados sítios pobres para a replicação de

víriões intactos (fase lítica de replicação). Para confirmar a relação entre os CILs e a replicação viral do ChHV5, Work et al., (2014) analisaram 381 tumores para a presença de CILs e descobriram que, em geral, cerca de 35% (6/17) das tartarugas verdes tiveram replicação lítica em tumores de pele, com apenas 7% (27/381) dos tumores mostrando a replicação lítica. Algumas tartarugas (11%) apresentaram mais de 30% dos casos com a replicação viral lítica, cuja ocorrência era mais provável em tumores menores. Quando presentes em um tumor, os CILs estavam englobados em um único foco de epiderme com cerca de, no máximo, 1 mm de diâmetro e localizavam-se, mais frequentemente, na região anterior do corpo dos animais: escudos (n = 4 ou 25%), boca (n = 19 ou 16%), pescoço (n = 78 ou 8%), do olho (n = 42 ou 7%), nadadeiras (n = 214 ou 6%), ou na cavidade oral (n = 17 ou 6%). Nenhum tumor com CILs foi visto na cauda (n = 7) (Work et al., 2014).

Transcritos de RNAm de ChHV5 foram detectados por hibridização *in situ* em fibropapilomas a partir da pele ou conjuntiva de tartarugas verdes provenientes de duas ilhas em Porto Rico. As reações positivas estavam confinadas aos núcleos de aglomerados de células epiteliais. O DNA viral foi detectado por ribossonda tanto em fibropapilomas como em fibromas, porém, os sinais estavam confinados apenas nos núcleos de células epiteliais e não foram vistos em áreas fibrosas dos tumores (derme) (Kang et al., 2008).

Entretanto, Work et al., 2009 verificaram que o número de cópias da DNA polimerase de ChHV5 encontradas na derme, a partir de tumores de *C. mydas* (N=18), era significativamente mais elevado que os encontrados na epiderme e não encontraram uma relação significativa entre o tamanho do tumor e os níveis de DNA polimerase viral.

Em estudo mais recente, para identificar melhor a localização do genoma de ChHV5 em tecidos de pele normal de tartaruga livre de tumor, Page-Karjian et al., (2012), utilizaram a técnica de captura e microdissecção a laser, que permite localizar precisamente um segmento específico de ácido nucleico dentro de um corte histológico, e detectaram DNA viral em ambas as camadas, epiderme e derme.

Além disso, a replicação ativa de ChHV5, nos corpúsculos de inclusão nos núcleos das células hospedeiras, foi confirmada pela reação específica utilizando antissoro produzido contra a proteína do capsídeo F-VP26 que se localiza no núcleo da célula hospedeira durante a replicação viral, comprovando ser esta uma rota viável de transmissão viral. Segundo os pesquisadores, ao contrário de outras doenças neoplásicas induzidas por vírus, FP é uma doença que pode depender superespalhadores para sua disseminação (Work et al., 2014).

1.8 Curso clínico da doença

Os animais acometidos apresentam-se severamente debilitados, geralmente apresentando distúrbios de flutuação, caquexia, hipoproteïnemia, desbalanço eletrolítico, uremia, e elevação de enzimas hepáticas (Norton et al., 1990). A caquexia pode ser causada por qualquer combinação de fatores: a incapacidade de locomoção, ingerir ou digerir os alimentos; demanda excessiva de energia em função do crescimento e proliferação de tumores; aumento energético para a locomoção; efeitos fisiológicos de certas citocinas, tais como o fator de necrose tumoral, mediada pelo sistema imune; e/ou por doenças concomitantes (Herbst, 1994).

O perfil hematológico resulta em anemia não regenerativa e diminuição progressiva da contagem de linfócitos, basófilos, eosinófilos e aumento progressivo de heterófilos e monócitos, concomitante ao aumento da gravidade da doença (Norton et al., 1990). Cabe salientar, no entanto, que a maioria dos animais estudados apresentava também infestação por hemoparasitas, o que poderia provocar tais alterações (Adnyana et al., 1997; Work, Balazs, 1999).

Sinais bioquímicos de imunossupressão e estresse crônico também têm sido observados. Ainda não está claro, entretanto, se a imunossupressão ocorre como um resultado de ou como um precursor para o desenvolvimento da FP. Embora essa relação entre a imunossupressão e a doença ainda deva ser confirmada, há evidências de que as tartarugas acometidas pela FP tornam-se susceptíveis a infecções secundárias e patógenos oportunistas (dos Santos et al., 2010; Stacy et al., 2008; Work et al., 2001, 2003).

Sabe-se que a intensa infestação parasitária por trematódeos cardiovasculares debilita severamente o hospedeiro, o que poderia dificultar sua defesa contra a fibropapilomatose (Adnyana et al., 1997; Aguirre et al., 1998; Jacobson et al., 1991).

O curso clínico e a duração da doença são pouco compreendidos. Sabe-se, no entanto, que há casos de remissão dos tumores, bem como de aumento do tamanho destes e surgimento de novas formações. O curso clínico da doença pode ainda se manter estável (Ehrhart et al., 1986, 1991; Jacobson, 1989).

Ehrhart (1991) constatou que aproximadamente 16% de tartarugas verdes recapturadas estavam livres de tumores em relação à primeira captura. Regressão de tumores também foi observada por Bennett et al. (1999) em 32% de tartarugas doentes e em 88% de tartarugas recapturadas (Hirama, Ehrhart, 2007).

No Brasil, no período de 2007 e 2008, tartarugas marinhas capturadas na Baía do Espírito Santo, região onde a FP foi considerada particularmente grave, com prevalência de 58,3% e média de 40 tumores por animal, após recaptura, 41% (5/12) das tartarugas anteriormente livres de tumor revelaram FP, muitas vezes, aumentando em gravidade com o tempo, e muito poucas (12%, 3/25) tartarugas mostraram sinais de regressão da doença (dos Santos et al., 2010).

Do total de 233 tartarugas capturadas na região costeira de Itaipu, orla oceânica de Niterói/RJ, no período de 2008 a 2013, 57 animais (63,3%) apresentavam fibropapilomas visíveis na primeira captura, 33 animais (36,7%) passaram a apresentar sinais de tumores apenas na recaptura e 7 animais (13,2%) apresentaram sinais evidentes de regressão de tumor em pelo menos um tumor (Tagliolatto, 2013).

1.9 Características gerais dos herpesvírus

1.9.1 Classificação

Os herpesvírus tem uma ampla distribuição entre animais de sangue quente e frio, sendo capazes de infectar diferentes espécies. Mais de 200 espécies pertencem à família Herpesviridae e já foram descritas até o momento. Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV), a família Herpesviridae divide-se em três subfamílias: Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae e Gammaherpesvirinae.

A subfamília Alphaherpesvirinae compreendendo herpesvírus de mamíferos, aves e répteis e está dividida em seis gêneros: *Itovirus* e *Mardivirus* que infectam aves; *Simplexvirus* que inclui, entre outros, as espécies que infectam seres humanos - o *Herpes Simplex Tipo 1* (HSV1) e o *Herpes Simplex Tipo 2* (HSV2) ou *Human alphaherpesvirus 1* e *Human alphaherpesvirus 2* e o *Varicellovirus* que inclui, entre outros, o herpesvírus humano *Human alphaherpesvirus 3*.

Os dois outros gêneros referem-se aos herpesvírus que infectam os quelônios: o *Scutavirus*, recentemente criado, cuja única espécie é o *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5), associado à fibropapilomatose de tartarugas marinhas e o outro gênero, ainda sem denominação, cujo representante é o *Chelonid alphaherpesvirus 6*, está associado à doença *Lung-eye-trachea* (LETV), responsável por acometer concomitantemente pulmão, olho e traqueia de tartarugas marinhas (Coberley et al., 2002; Curry et al., 2000). Embora outros herpesvírus de quelônios de águas salgadas já tenham sido descritos, como o ChHV1, associado à doença *Grey Patch Disease* (GPD) (Rebell et al., 1975), o ChHV2, o ChHV3 e o ChHV4, até a presente data não foram nem reconhecidos e nem classificados pelo ICTV (Davison, McGeoch, 2010).

As espécies mais conhecidas que pertencem às subfamílias Betaherpesvirinae e Gammaherpesvirinae são: o citomegalovírus humano *Human betaherpesvirus 5* (CMV), gênero *Cytomegalovirus*; o *Human gammaherpesvirus 4*, conhecido como Epstein-Barr (EBV), gênero *Lymphocryptovirus*, e o *Human gammaherpesvirus 8*, agente causador do Sarcoma de Kaposi em humanos, respectivamente.

Duas outras famílias ainda fazem parte da ordem Herpesvirales: a família Alloherpesviridae que inclui os vírus de peixes e anfíbios e a família Malacoherpesviridae que, por sua vez, inclui os herpesvírus de moluscos. A figura X apresenta a classificação completa dos herpesvírus, segundo o ICTV (2015).

Desde suas primeiras descrições, o herpesvírus associado à fibropapilomatose de tartarugas marinhas teve várias denominações como: *Green turtle fibropapillomatosis-associated herpesvirus* (Herbst et al. 1996, 1998; Quackenbush et al., 1998); *Green turtle herpesvirus* (Lu et al., 2000; Nigro et al., 2004); *Fibropapillomatosis-associated herpesvirus* (FPHV) (Chaloupka et al., 2009; Lackovich et al., 1999; Work et al., 2004); *Fibropapilloma-associated turtle herpesvirus* (FPTHV) ou *Fibropapilloma-associated marine turtle herpesvirus* (Greenblatt et al., 2004, 2005; Kang et al., 2008; Quackenbush et al., 2001; Work et al., 2009); *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) ou *Chelonid herpesvirus 5* (ChHV5) (Ackermann et al., 2012; Alfaro-Nunez et al., 2014; Flint et al., 2010; Herbst et al., 2004; Page-Karjian et al., 2014; Patrício et al., 2012).

No presente estudo será referido conforme a classificação atual, *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5).

Order: Herpesvirales			
Family: Herpesviridae			Family: Alloherpesviridae
Subfamily: Alphaherpesvirinae	Subfamily: Betaherpesvirinae	Subfamily: Gammaherpesvirinae	Genus: Batrachovirus
Genus: Iltovirus	Genus: Cytomegalovirus	Genus: Lymphocryptovirus	Ranid herpesvirus 1
Gallid alphaherpesvirus 1	Aotine betaherpesvirus 1	Callitrichine gammaherpesvirus 3	Ranid herpesvirus 2
Psittacid alphaherpesvirus 1	Cebine betaherpesvirus 1	Cercopithecine gammaherpesvirus 14	Genus: Cyprinivirus
Genus: Mardivirus	Cercopithecine betaherpesvirus 5	Gorilline gammaherpesvirus 1	Anguillid herpesvirus 1
Anatid alphaherpesvirus 1	Human betaherpesvirus 5	Human gammaherpesvirus 4	Cyprinid herpesvirus 1
Columbid alphaherpesvirus 1	Macacine betaherpesvirus 3	Macacine gammaherpesvirus 4	Cyprinid herpesvirus 2
Gallid alphaherpesvirus 2	Panine betaherpesvirus 2	Panine gammaherpesvirus 1	Cyprinid herpesvirus 3
Gallid alphaherpesvirus 3	Papiine betaherpesvirus 3	Papiine gammaherpesvirus 1	Genus: Ictalurivirus
Meleagrid alphaherpesvirus 1	Saimiriine betaherpesvirus 4	Pongine gammaherpesvirus 2	Acipenserid herpesvirus 2
Genus: Scutavirus	Genus: Muromegalovirus	Genus: Macavirus	Ictalurid herpesvirus 1
Chelonid alphaherpesvirus 5	Murid betaherpesvirus 1	Alcelaphine gammaherpesvirus 1	Ictalurid herpesvirus 2
Genus: Simplexvirus	Murid betaherpesvirus 2	Alcelaphine gammaherpesvirus 2	Genus: Salmonivirus
Ateline alphaherpesvirus 1	Murid betaherpesvirus 8	Bovine gammaherpesvirus 6	Salmonid herpesvirus 1
Bovine alphaherpesvirus 2	Genus: Proboscivirus	Caprine gammaherpesvirus 2	Salmonid herpesvirus 2
Cercopithecine alphaherpesvirus 2	Elephantid betaherpesvirus 1	Hippotragine gammaherpesvirus 1	Salmonid herpesvirus 3
Human alphaherpesvirus 1	Genus: Roseolovirus	Ovine gammaherpesvirus 2	
Human alphaherpesvirus 2	Human betaherpesvirus 7	Suid gammaherpesvirus 3	
Leporid alphaherpesvirus 4	Human betaherpesvirus 6A	Suid gammaherpesvirus 4	Family: Malacoherpesviridae
Macacine alphaherpesvirus 1	Human betaherpesvirus 6B	Suid gammaherpesvirus 5	Genus: Aurivirus
Macropodid alphaherpesvirus 1	Genus: Unassigned	Genus: Percavirus	Haliotid herpesvirus 1
Macropodid alphaherpesvirus 2	Caviid betaherpesvirus 2	Equid gammaherpesvirus 2	Genus: Ostreavirus
Panine alphaherpesvirus 3	Suid betaherpesvirus 2	Equid gammaherpesvirus 5	Ostreid herpesvirus 1
Papiine alphaherpesvirus 2	Tupaiaid betaherpesvirus 1	Mustelid gammaherpesvirus 1	
Saimiriine alphaherpesvirus 1		Genus: Rhadinovirus	
Genus: Unassigned		Ateline gammaherpesvirus 2	
Chelonid alphaherpesvirus 6		Ateline gammaherpesvirus 3	
Genus: Varicellovirus		Bovine gammaherpesvirus 4	
Bovine alphaherpesvirus 1		Cricetid gammaherpesvirus 2	
Bovine alphaherpesvirus 5		Human gammaherpesvirus 8	
Bubaline alphaherpesvirus 1		Macacine gammaherpesvirus 5	
Canid alphaherpesvirus 1		Murid gammaherpesvirus 4	
Caprine alphaherpesvirus 1		Murid gammaherpesvirus 7	
Cercopithecine alphaherpesvirus 9		Saimiriine gammaherpesvirus 2	
Cervid alphaherpesvirus 1		Genus: Unassigned	
Cervid alphaherpesvirus 2		Equid gammaherpesvirus 7	
Equid alphaherpesvirus 1		Phocid gammaherpesvirus 2	
Equid alphaherpesvirus 3		Saguinine gammaherpesvirus 1	
Equid alphaherpesvirus 4		Genus: Unassigned	
Equid alphaherpesvirus 8		Iguanid herpesvirus 2	
Equid alphaherpesvirus 9			
Felid alphaherpesvirus 1			
Human alphaherpesvirus 3			
Phocid alphaherpesvirus 1			
Suid alphaherpesvirus 1			

Classificação dos herpesvírus segundo o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) - International Committee on Taxonomy of Viruses, 2015.

Figura 2 - Classificação da Família Herpesviridae segundo o Comitê Internacional de Classificação dos Vírus (ICTV), 2015. Todas as espécies dentro dos seus respectivos gêneros, famílias e subfamílias estão descritas. Em destaque o Gênero *Scutavirus* e a respectiva espécie (em vermelho).

1.9.2 Propriedades gerais dos herpesvírus

1.9.2.1 Estrutura viral

Os herpesvírus são vírus esféricos com estruturas complexas. A partícula viral compreende quatro elementos: o core, o capsídeo, o tegumento e o envelope.

O core consiste de um filamento linear de DNA dupla fita (dsDNA), apenas uma pequena porção do DNA pode ser circular. O tamanho do genoma varia de 125 a 295 kpb, devido a presença de sequências repetitivas que variam muito quanto ao número de cópias (Pellet, Roizman, 2007), com sequências longas e curtas, denominadas de UL e US, respectivamente. O genoma é empacotado na forma de toróide e pode codificar aproximadamente de 70 a 200 proteínas.

O capsídeo tem simetria icosaédrica, formado por 162 capsômeros, sendo 12 pentaméricos e 150 hexaméricos. O capsídeo é formado por seis proteínas: VP5 (UL19), VP26 (UL35), VP23 (UL18) e VP19C (UL38), que compõe a camada exterior, além das proteínas UL6 e a VP24 (UL26) que compõe a camada intermediária. (Pellet, Roizman, 2007).

O capsídeo, por sua vez, é circundado por uma camada proteica largamente desestruturada chamada de tegumento. A estrutura do tegumento consiste de, no mínimo, 20 proteínas e há evidências de que existam duas camadas no tegumento, uma interna, associada ao capsídeo e outra externa, associada ao envelope. A mais notável das proteínas associadas ao tegumento é a proteína VP16, codificada pela ORF UL48; a proteína VP22 (UL49), que tem a capacidade de espalhar-se de célula a célula e uma proteína muito grande (VP1-2; UL36), está envolvido na liberação do DNA viral no poro nuclear durante a entrada do vírus. Outras proteínas do tegumento incluem UL14, UL17, VP11/12 (gene UL46), VP13/14 (UL47), US9, US10 e US11 (Pellet, Roizman, 2007).

O envelope viral é uma bicamada lipídica com aproximadamente 11 diferentes glicoproteínas inseridas, sendo as principais a gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gL e gM, além de outras duas codificadas pelos genes UL20 e US9 e possivelmente mais três proteínas não-glicosiladas (Pellet, Roizman, 2007). Dependendo da espessura do tegumento, a partícula viral pode variar de 120 a 260 nm de diâmetro. Quanto aos lipídeos do envelope, assume-se que o HSV os adquire do seu hospedeiro e, alguns estudos sugerem que eles são semelhantes aos das membranas citoplasmáticas e diferentes das membranas nucleares de células não infectadas (Van Genderen et al., 1994).

A Figura 3 apresenta uma representação esquemática da partícula viral de herpesvírus(A), assim como, micrografias eletrônicas de partículas virais de *Herpes Simplex Tipo 1* (B) e de herpesvírus de quelônios ChHV5 (C e D).

Figura 3 - (A) Representação esquemática da partícula viral de herpesvírus, extraído de Carter, 2007; (B-D) Micrografias eletrônicas de herpesvírus. (B) Partículas virais de HSV-1, http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/10235/10235_lores.jpg; (C-D) Partícula viral de ChHV5. Em (C) Vírião brotando da membrana nuclear e em (D) Vírião maduro envelopado dentro do citoplasma, extraído de Herbst et al., (1995).

1.9.2.2 Organização do genoma

Vários tipos de genomas de herpesvírus são conhecidos e sua organização pode variar dependendo do número, da posição e da direção das sequências. De uma maneira geral o genoma dos herpesvírus, é dividido em duas regiões: uma sequência longa única (UL) e uma sequência curta única (US) acompanhadas por sequências de repetições. Entre quatro e seis tipos de genoma de herpesvírus foram descritos até o momento, conhecidos como Tipo 1 a 4 (Fauquet et al., 2005) e como Tipo A a F (Pellet, Roizman, 2007).

Os herpesvírus *Herpes Simplex Tipo-1* (HSV-1) e *Herpes Simplex Tipo-2* (HSV-2) foram os primeiros herpesvírus humanos a serem descobertos e estão entre os mais intensamente investigados de todos os herpesvírus, por isso a organização dos genomas, assim como, as funções dos respectivos genes são bem conhecidas (Knipe, fields). Além disso, tem sido usado como referência entre os herpesvírus, por isso descrevo, a seguir, os dados mais relevantes como possível parâmetro de comparação e/ou esclarecimento em relação às funções dos genes de herpesvírus de tartarugas marinhas. O genoma dos herpes simplex vírus pode ser dividido em seis importantes regiões: (a) Sequências 'a', importantes na circularização do DNA viral e no empacotamento do DNA no vírion; (b) RL - Sequência longa repetida de 9 kpb que codifica a proteína regulatória inicial, o promotor e a maioria dos genes associados à latência; (c) UL – Região longa única, de 108 kpb, que codifica pelo menos 56 diferentes proteínas que participam da replicação do DNA, da síntese das proteínas do cápside e de outras proteínas; (d) RS – Região de repetições curta, de 6,6 kpb, que codifica uma poderosa proteína ativadora transcricional, relacionada com expressão de genes que levam a replicação viral; (e) OriL – a origem de replicação, que localiza-se no meio da região UL; (f) US – Região curta única, codifica 12 ORFs (*Open reading frame*), entre as quais glicoproteínas importantes na formação dos vírus e nos mecanismos de defesa do organismo (Pellet, Roizman, 2007).

Entretanto, no caso dos ChHV5, somente a partir de 1998, sequências curtas do DNA viral dos herpesvírus de quelônios ChHV5 foram descritas e depositadas no GenBank (Ene et al., 2005; Greenblatt et al., 2005; Herbst et al., 2008; Quackenbush et al., 1998, 2001; Stacy et al., 2008; Work et al., 2009; Yu et al., 2001), possibilitando os primeiros estudos relacionados ao genoma desses vírus.

Em 2004, Herbst et al., montaram uma sequência de 43.843 pb do genoma do ChHV5, descrevendo pela primeira vez a organização parcial do genoma. A região descrita, compreendida entre a região longa única UL9 até UL30, compreende 20

genes que são ortólogos aos genes cognatos de outros alfaherpesvírus e é organizada de uma forma semelhante. O estudo descreveu ainda um novo segmento de 4 Kb, entre as regiões UL15 e UL18, que não é equivalente a nenhum outro herpesvírus descrito. Segundo os autores, a análise filogenética gerada, baseada na região UL27, mostrou que o ChHV5 é relacionado aos alfaherpesvírus e mais estreitamente relacionado ao outro herpesvírus não oncogênico de tartarugas marinhas, o C-LET-HV.

Somente no final de 2012, Ackermann et al., após o sequenciamento completo do genoma viral, obtido a partir de DNA viral clonado em um vetor BAC, proveniente de tumores de tartaruga, descreveram sua organização. A estrutura global da molécula clonada correspondeu em tamanho e configuração (TRS-US-IRS-UL) a um genoma de tipo D, que é típico para os membros do gênero *Varicellovirus* da subfamília Alphaherpesvirinae.

A sequência completa do genoma dos ChHV5, segundo o estudo, compreende um total de 132.233 pb de DNA, dividida em uma sequência longa única (UL) com 101.152 pb; uma sequência curta única (US) com 13.319 pb, e seqüências repetidas invertidas (IRS) com 8.831 pb cada, que ladeiam a seqüência curta (US). As sequências obtidas corresponderam em 98 a 100% em similaridade com alphaherpesvirus já descritos, através de análise com BLAST, exceto por 38 sequências que foram designadas como ORFs (*Open reading frames*) que potencialmente codificam para proteínas hipotéticas (HP). Os pesquisadores adotaram a letra F seguida dos ORFs para designar as regiões relacionadas à FP. A região do gene UL-52 de ChHV5, denominada F-UL52, também revelou que pertence ao complexo helicase/primase, que é essencial para a replicação de herpesvírus (Ackermann et al., 2012).

Dentro do genoma completo foram identificados 12 ORFs com mais de 40 códons nas IRS, que codificam para 15 potenciais proteínas diferentes; 11 ORFs dentro da sequência US, 5 numa direção (para frente) e 6 na direção oposta; 76 ORFs dentro da sequência de UL, 40 em uma direção e 36 na direção oposta. Apesar da sequência UL ter se mostrado colinear principalmente com os genomas de alphaherpesviruses típicos, 46 ORFs mostraram fortes semelhanças com os genes UL de outros herpesvírus. Da mesma forma, várias das proteínas previstas na região US não mostraram estreita relação com proteínas conhecidas de outros herpesvírus (Ackermann et al., 2012). A figura 4 apresenta a representação esquemática da organização do genoma dos ChHV5.

Figura 4 - Mapa do genoma completo de ChHV5, determinado a partir de vetor BAC CH-651-6009. O mapa da cadeia dupla linear mostra as sequências de repetição (TRS e IRS) em marrom, as sequências únicas (US e UL) em cinza e as sequências de fases de leitura aberta (ORFs) em amarelo. A orientação relativa de cada ORF é simbolizada na direção representada pela seta. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046623.g001>. Extraído de Ackermann et al., (2012).

Além disso, Ackermann et al., (2012) verificaram que o ChHV5 possuem quatro genes atípicos que compartilham similaridades com outros herpesvírus das subfamílias Betaherpesvirinae e Gammaherpesvirinae, sugerindo que o ChHV5 podem combinar características das três subfamílias. Dois membros do domínio da superfamília lectina de tipo C (F-LEC1, F-LEC2), que são proteínas de membrana do tipo II, um ortólogo de CMV de rato (F-M04) e uma sialiltransferase viral (F-sial). De acordo com a sequência de aminoácidos (aa), F-M04 é uma proteína de membrana do tipo I, com uma sequência de sinal (1-24 aa), um domínio extracelular (25-230 aa), uma região transmembrana (231-253 aa) e uma cauda citoplasmática (254-270 aa). Enquanto o gene F-M04, só havia sido descrito em betaherpesvírus, o gene F-sial foi encontrado em gammaherpesvirus (BoHV4), em outras famílias de vírus como os poxvírus e os baculovírus, e também em células hospedeiras (Markine-Goriaynoff et al., 2004). Ortólogos a F-LEC1 e F-LEC2, foram detectados no genoma de CMV de rato, bem como vários vírus citoplasmáticos de DNA, ou seja, os poxvírus e os asfarvírus, respectivamente (Neilan et al., 1999; Voigt et al., 2001; Wilcock et al., 1999).

Estes genes atípicos aparentemente podem estar relacionados com a replicação viral e a atividade anti-apoptótica e, portanto, desempenhar um papel na patogênese da formação de tumores ou em desvio imune (Ackermann et al., 2012).

1.10 Epidemiologia dos ChHV5

A partir de 1998, o DNA do ChHV5 foi detectado consistentemente por métodos moleculares em amostras de tecidos tumorais de tartarugas marinhas de espécies e regiões diferentes, e as sequências gênicas parciais obtidas descritas e depositadas no *GenBank* (Ene et al., 2005; Greenblatt et al., 2005; Herbst et al., 2008; Quackenbush et al., 1998, 2001; Stacy et al., 2008; Work et al., 2009; Yu et al., 2001). A análise filogenética dessas sequências permitiu classificá-lo na subfamília Alphaherpesvirinae, no recém-criado gênero *Scutavirus*, além de identificar variantes gênicas em distintas regiões do globo.

Herbst et al., (2004) definiu as variantes detectadas de ChHV5 (A, B, C e D), agrupadas em dois grandes clados, como representantes do Atlântico (amostras da Flórida) ou do Pacífico (amostras da Austrália, Costa Rica, Havaí e México).

Em 2005, Ene et, al., utilizando sequenciamento de produtos amplificados, 1353 pb (amplicon V) e 1213 pb (amplicon IV) da região compreendida entre os segmentos UL15 e UL18 do genoma viral, detectados em tartarugas marinhas das espécies *Chelonia mydas* (*Cm*), *Caretta caretta* (*Cc*) e *Lepidochelys kempii* (*Lk*) demonstraram que existem 4 variantes evolutivas do vírus ChHV5 em diferentes áreas costeiras da Flórida, designados como variantes A, B, C e D. A Figura 5 apresenta as diferentes áreas do estudo, assim como, a distribuição dos variantes encontrados por região nas três espécies estudadas.

Figura 5 - Distribuição dos variantes A, B, C E D de ChHV5 em áreas costeiras ao redor da Flórida. Os vírus foram sequenciados de fibropapilomas de tartarugas provenientes de diferentes locais no mapa. A distribuição dos variantes virais dentro das espécies indicadas está mostrada para cada área. Números mostram quantos indivíduos foram infectados com a respectiva cepa. Extraído de Ene et al., 2005.

A prevalência desses variantes na Flórida variou conforme a região de coleta, sendo a variante A mais prevalente e encontrada nas três áreas. Mais que 94% das tartarugas verdes e 70% das cabeçudas (*Cc*) apresentaram essa variante. As variantes A e C estavam presentes em múltiplas espécies, entretanto, a variante B foi encontrada exclusivamente no estuário *Indian River Lagoon* (*IRL*), detectada em >94% das tartarugas da espécie *Cm*. Além desse variante essa espécie foi infectada com os variantes A, e C e, em uma única amostra do estuário, foi observada uma coinfeção com os variantes A e B. Os autores sugerem que a geografia do estuário *IRL*, que

compreende três lagoas estuarinas rasas interconectadas, provavelmente fornece condições ideais para a heterogeneidade na distribuição dos vírus, além disso, a limitada saída de tartarugas infectadas dessas lagoas também limita a dispersão do variante B para outros locais. O estudo ainda conclui que a distribuição heterogênea dos variantes virais apoia fortemente a hipótese de que, durante epizootias, as tartarugas são infectadas com o variante específico depois que elas chegam como juvenis em habitat neríticos (Ene et al., 2005).

Quatro grupos regionais foram identificados por Greenblatt et al., (2005), que também encontraram heterogeneidade espacial entre variantes do ChHV5, em uma escala geográfica maior: Pacífico oriental, Atlântico ocidental/ leste do Caribe, Centro-Oeste do Pacífico e Atlântico sendo que amostras provenientes de Porto Rico não se agruparam em nenhum ramo.

Entretanto, em um estudo recente, Patrício et al., (2012) compararam amostras de FP e pele de nove tartarugas verdes de Porto Rico, coletadas entre 2005 e 2010, e de seis tartarugas verdes da Ilha do Príncipe, Golfo da Guiné, coletadas em 2009, com sequências parciais de genes de ChHV5 adquiridas do *Genbank*. As regiões compreendidas para as análises foram provenientes dos genes da DNA polimerase (483 pb), UL18 (1212 pb), UL34 (861 pb) e da glicoproteína B (2486 pb) de animais das espécies *C. mydas*, *C. caretta*, *L. olivacea*, *L. Kempii* de nove áreas geográficas: Flórida, Barbados, Porto Rico, São Diego, Havaí, México, Costa Rica, Austrália e do Golfo da Guiné. O estudo identificou, após análises filogenéticas utilizando *supermatrix* de genes e genes individuais, quatro grupos filogeográficos: leste do Pacífico, Atlântico ocidental/leste do Caribe, centro-oeste do Pacífico e Atlântico e inseriu na filogenia do ChHV5 as amostras de Porto Rico e Golfo da Guiné, sugerindo um fluxo recente de genes entre essas regiões. Além disso, também demonstraram que espécies simpátricas de tartarugas marinhas foram infectadas com a mesma variante viral, reforçando assim os resultados obtidos por Herbst et al., (2004) e Ene et al., (2005). O estudo conclui que o padrão filogeográfico do ChHV5 parece refletir os movimentos do hospedeiro e que os ambientes alterados parecem estar implicados nos surtos atuais de FP e na história evolutiva moderna do vírus.

Em 2013, seis sequências parciais de DNA polimerase viral (483pb) dos ChHV5 de amostras tumorais provenientes do Brasil, coletadas no período 2009 a 2010, foram disponibilizadas no banco de dados mundial, sendo três delas oriundas de São Paulo (Rodenbusch et al., 2013). A análise filogenética revelou que quatro sequências foram semelhantes ao grupo filogeográfico do Atlântico, denominadas variante 1 (JN938584) e variante 2 (JN938585), detectadas somente em SP, variante

3 (JN938586), detectada somente no ES, e variante 4 (JN938587), a mais frequentemente detectada (59,4%), proveniente dos estados de SP, BA e ES. Além disso, duas amostras agruparam-se no grupo do Atlântico ocidental/leste do Caribe, variante 5 (JN938588) da BA e variante 6 (JN938589) do CE. O estudo ainda relata que duas amostras, provenientes dos estados de São Paulo e da Bahia, apresentaram co-infecção com mais de uma variante. Dos tumores coletados, 73% foram positivos pelo PCR convencional e 87% pelo *Real-Time* PCR, e a carga viral variou entre 0,011 e 118,62 cópias por célula. Segundo os autores, as diferenças obtidas no número de cópias pode indicar que as amostras foram coletadas de tumores em diferentes estágios.

1.11 Análises filogenéticas do ChHV5

As recentes análises filogenéticas realizadas revelaram que os ChHV5 se agruparam com vários herpesvírus de outras espécies (Ackermann et al., 2012).

A análise específica do produto traduzido da região F-UL52 sugeriu uma relação com proteínas da região UL52 de vários outros alfa herpesvírus de animais, incluindo herpesvírus equinos (EHV1), bovinos (BoHV1), suínos (SuHV1), de perus (MeHV1) e aviários (GaHV1, 2 e 3). A Figura 2 apresenta a classificação destes herpesvírus.

Uma relação mais distante também foi revelada com betaherpesvírus, por exemplo, com o citomegalovírus humano (HCMV) e o de chimpanzé (PaHV2). Após o alinhamento das sequências dos aminoácidos dessa região e das análises filogenéticas, as espécies F-UL52 recém-descobertas surgiram no mesmo ramo com alfa herpesvírus de bezerros e de suínos (doença de Aujeszky's) e citomegalovírus enquanto que os alfa herpesvírus aviários agruparam-se em um ramo diferente (Ackermann et al., 2012).

1.12 Evolução dos ChHV5

Baseados em taxas de substituição de herpesvírus, alguns estudos foram realizados para estimar a taxa evolutiva dos ChHV5 e hipóteses foram levantadas acerca da provável época do surgimento desses vírus e seus variantes.

Segundo Herbst et al., (2004), as divergências encontradas entre os variantes da Flórida e do Havaí assim como entre os clados do Atlântico e Pacífico ocorreu em torno de 0,6-1,6 e 1,6-4,0 milhões de anos atrás, respectivamente, além disso, o

surgimento do Istmo do Panamá, que ocorreu cerca de 3,1-3,5 milhões de anos atrás, teria impedido a troca de vírus entre o Atlântico/Caribe e o Pacífico. Baseados nisso, os autores hipotetizaram que as divergências encontradas dataram de 3,1-3,5 milhões de anos atrás para ChHV5 de tartarugas verdes da Flórida e do Havaí e cerca de 7,9-8,9 milhões de anos atrás entre a variante D e os variantes A, B, C.

Recentemente, outro estudo estimou que o tempo médio para o surgimento do ancestral comum das variantes do ChHV5 conhecidas foi de 192,90-429,71 anos, muito mais recente que as estimativas anteriores (Patrício et al., 2012).

Apesar das divergências temporais encontradas entre os estudos de evolução dos ChHV5, ambos estudos demonstraram que o ChHV5 co-evoluiu com seu hospedeiro e reforçaram que a pandemia mundial de FP nem é causada por um novo vírus e nem é resultante de recentes mutações adquiridas pelo ChHV5, mas que os fatores ambientais parecem estar implicados nos surtos atuais da fibropapilomatose e no desenvolvimento das lesões (Herbst et al., 2004; Patrício et al., 2012).

1.13 Possíveis vias de transmissão viral

No Brasil, sequências do gene da polimerase viral, comum aos herpesvírus humanos e de animais, foram detectadas pela reação de PCR, tanto em amostras tumorais como em amostras de sangue, saliva e de secreções oculares de animais com FP em um estudo prévio (Menhert et al., 2002; Monezi et al., 2006).

Em 2001, amostras de sangue, saliva e secreção ocular, além de amostras de tumores, de tartarugas marinhas da espécie *C. mydas* com FP provenientes da região de Ubatuba/SP, litoral norte do Estado de São Paulo, foram coletadas visando à detecção de um possível herpesvírus ou papilomavírus (Mehnert et al., 2001). Os resultados obtidos pela microscopia eletrônica e pelas reações de PCR, utilizando *primers* descritos por Vandevanter et al., (1996) revelaram a presença de um possível herpesvírus nas amostras analisadas. Em um estudo mais recente, Monezi et al., (2006), analisaram amostras de sangue além de tumor de animais provenientes da mesma região no período de 2001-2006 e a presença da banda específica de 207 pb dos herpesvírus também foi confirmada.

Entretanto, até meados de 2015, não existiam relatos na literatura mundial de detecção do ChHV5 em sangue e secreções de animais com e sem fibropapilomatose.

Em 2015, Page-Karjian et al., utilizando o ensaio molecular quantitativo de *Real Time PCR (qPCR)*, cuja região alvo do genoma foi a região UL30, avaliaram a relação entre as cargas virais de ChHV5 e a doença, em animais sintomáticos e

assintomáticos, e investigaram as potenciais vias de eliminação desses vírus. Para esse propósito, amostras de tecido, sangue, urina, saliva e fezes foram coletadas de 67 tartarugas verdes provenientes do sudeste dos estados Unidos, das regiões da Flórida e Georgia. ChHV5 foi detectado em amostras de sangue, urina, *swab* cloacal e plasma, além de tecidos tumorais e pele não tumoral de animais com sinais clínicos de FP (grupo A), animais com histórico de FP, mas sem sinais clínicos (grupo B) e animais sem histórico de FP (grupo C).

Em 2015, Page-Karjian et al., utilizando o ensaio molecular quantitativo de *Real Time PCR (qPCR)*, cuja região alvo do genoma foi a região UL30, avaliaram a relação entre as cargas virais de ChHV5 e a doença, em animais sintomáticos e assintomáticos, e investigaram as potenciais vias de eliminação desses vírus. Para esse propósito, amostras tumorais, de sangue e de secreções foram coletadas de 67 tartarugas verdes provenientes do sudeste dos estados Unidos, das regiões da Flórida e Georgia, divididos em três grupos de animais: com sinais clínicos de FP (grupo A), com histórico de FP, mas sem sinais clínicos (grupo B) e sem histórico de FP (grupo C).

Do total (351) de amostras coletadas, ChHV5 foi detectado em 33,3%, 46,2% e 25,8% das amostras de sangue; 9,5%, 7,7% e 6,5% no plasma; 66,7%, 60% e 11,1% na urina; 37,5%, 23,1% e 12,9% dos *swabs* cloacais dos animais dos grupos A, B e C, respectivamente. Entretanto, ChHV5 não foi detectado em nenhuma das amostras de saliva e de fezes dos três grupos de animais examinados. Nos tecidos, o ChHV5 foi detectado em 100% das amostras dos animais do grupo A e, em pele aparentemente saudáveis, foi encontrado em 83,3% (grupo A), 100% (grupo B) e 22,2% (grupo C).

Segundo os autores, a presença de DNA viral no sangue pode sugerir um mecanismo de transporte viral para a pele. Por outro lado, a presença do DNA viral nas secreções sugere que os vírus podem ser eliminados por outras vias. Além disso, o elevado número de cópias de DNA encontrado em amostras dos tecidos tumorais e não tumorais, levou-os a crer que o ChHV5 está altamente associado com a formação dos tumores.

1.14 Fatores ambientais

Sabe-se que as tartarugas marinhas são particularmente suscetíveis a mudanças no seu ambiente, pois são animais de vida longa com uma história de vida complexa (Aguirre, Lutz, 2004). Sendo assim, qualquer dano ou destruição nos

ambientes que esses animais habitam pode ser nocivo e ter efeitos extremamente negativos sobre essas populações (Green Barrier Reef Marine Park Authority - GBRMPA, 2014; Hawkes et al., 2009, Poloczanska et al., 2010).

Tem sido sugerido que os fatores ambientais podem desempenhar um papel no desenvolvimento da FP (Adnyana et al., 1997; Aguirre, Lutz, 2004; Chaloupka et al., 2009; Herbst, 1994; Santos et al., 2010; Van Houtan et al., 2014). Além disso, a presença de contaminantes químicos pode ser parte de um problema multifatorial que leva a FP (Herbst, 1994). Estudos iniciais propuseram que esses contaminantes químicos presentes na água poderiam agir como imunotoxinas ou estavam causando danos a nível celular ou genético (Herbst, 1994).

Já foi demonstrado que a prevalência da FP em ambientes marinhos que sofrem com o impacto da atividade humana é maior, geralmente em regiões adjacentes associadas com a agricultura, indústria e desenvolvimento urbano (Herbst, 1994). A mesma correlação foi observada em estudos posteriores (Adnyana et al., 1997; Foley et al., 2005; Santos et al., 2010; Van Houtan et al., 2010).

Biotoxinas também vêm sendo implicadas como um cofator no estabelecimento do FP. Landsberg et al., (1999) verificaram que o protozoário *Prorocentrum* que produz o ácido ocadaico, um reconhecido indutor de tumores (Suganuma et al., 1988, Haystead et al., 1989, Cohen et al., 1990), presente na vegetação marinha e incluído na alimentação das tartarugas, era prevalente em áreas com alto risco de FP no Havaí. Do mesmo modo, concentrações da toxina *lyngbyatoxin A* no tecido, produzidos pela cianobactéria *Lyngbya majuscula*, foram correlacionados com a presença de fibropapilomas em *C. mydas* mortas (Arthur et al., 2006, 2008). Em estudos recentes, a arginina, que é um regulador da atividade imunológica e reconhecida por promover a replicação de herpesvírus e contribuir para a formação de tumores, além de ser um importante componente das glicoproteínas do envelope viral desses vírus, também tem sido associada a um aumento da prevalência da FP (Peranzoni et al., 2008; Van Houtan et al., 2010). Isto porque a proliferação de macroalgas invasivas no ambiente marinho resultou no aumento da concentração de arginina na dieta de tartarugas verdes, com aumento na ingestão, em até 14 vezes, em regiões com o fenômeno de eutrofização (Van Houtan et al., 2010, 2014). Embora o estudo de Van Houtan et al., (2014) tenha sido contestado, o nexa epidemiológico entre a prevalência da doença e ecologia alimentar encontrada nesse estudo proporcionou um forte apoio em que os fatores ambientais desempenham um papel no desenvolvimento desta doença (Jones et al., 2016). Em outro estudo, após análise de 82 bacias hidrográficas diferentes, utilizando um índice rico em informações de

eutrofização, verificou-se uma forte associação entre as taxas de FP, *nitrogen-footprints* e macroalgas consumidas pelas tartarugas (Van Houtan et al., 2010).

No Brasil, dos Santos et al., 2010, avaliaram a qualidade da água na presença de macrófitas bentônicos e os níveis de nutrientes, na região da Baía do Espírito Santo, e verificaram que as tartarugas verdes que residem em áreas com a qualidade da água degradada teve uma maior prevalência de FP, embora a poluição e a presença de contaminantes químicos não tenham sido considerados no estudo.

A temperatura da água e tendências sazonais também estão sendo consideradas no desenvolvimento e na taxa de crescimento da lesão. É possível que temperaturas da água mais quentes durante o verão promovam o crescimento da lesão (Herbst, 1994; Herbst et al., 1995). Embora uma tendência sazonal tenha sido observada na Flórida, com maior taxa de FP em tartarugas no inverno, isto não ocorreu no Havaí (Murakawa et al., 2000) porque, provavelmente, há menos flutuação sazonal da temperatura da água nesta região (Foley et al., 2005).

A predisposição genética também deve ser considerada, porém estudos genealógicos na espécie não foram realizados, sendo impossível fazer uma correlação direta com a etiologia da doença (Herbst, 1994).

Muitos aspectos da fibropapilomatose e do ChHV5 ainda precisam ser elucidados. Sendo assim, novos estudos de novas áreas geográficas poderão contribuir ainda mais para o esclarecimento da doença, assim como, com a circulação do vírus no meio ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

- Detectar e caracterizar herpesvírus associados à fibropapilomatose de quelônios, *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5), em tecidos tumorais, secreções oculares e saliva de tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas* capturadas em Ubatuba, SP, no período de 2001-2012.
- Caracterizar a histopatologia das massas tumorais coletadas.

2.2 Específicos

- Verificar a presença de corpúsculos de inclusões intranucleares de herpesvírus nos cortes histológicos obtidos.
- Verificar a presença de sequências gênicas dos herpesvírus ChHV5 em lisados tumorais e secreções pelas reações de PCR e de *nested*-PCR, previamente padronizadas.
- Sequenciar o gene da polimerase dos vírus detectados e compará-los com as sequências disponíveis no *GenBank*, análise filogenética.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e método de manejo

Tartarugas marinhas de vida livre da espécie *Chelonia mydas* (tartaruga verde), foram capturadas acidentalmente ou resgatadas em Ubatuba/SP, São Sebastião/SP e Angra dos Reis/RJ, pelas equipes de monitoramento do Projeto TAMAR-Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), sendo encaminhadas ao Centro de Reabilitação do Projeto TAMAR/ICMBio - Base de Ubatuba/SP, na área do litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil. Esta área representa área de alimentação dessa espécie.

Sessenta e um animais do presente estudo foram provenientes do Projeto TAMAR - Base de Ubatuba, além de cinco animais, provenientes do Aquário de Santos, do litoral sul do Estado de São Paulo. Cada animal recebeu um número de registro para identificação.

Os animais com fibropapiloma (FP), e debilitados, foram mantidos temporariamente no centro de reabilitação na Base de Ubatuba/SP do projeto TAMAR, litoral norte de São Paulo, em piscinas individuais com volume entre 500 e 1000L com temperaturas que oscilavam entre 20-25 °C. Entre 100 a 200 g da alga *Ulva* spp, coletada na própria região de Ubatuba, era oferecida aos animais de 3 a 4 vezes ao dia. Após o período de recuperação os animais foram liberados. Os animais sem FP foram identificados e liberados para o meio ambiente após colheita dos materiais clínicos.

3.2 Vírus padrões

Três amostras positivas para herpesvírus provenientes de estudo prévio (Monezi et al, 2006) foram cultivados como descrito no item 3.3 e utilizadas nos ensaios moleculares durante a padronização para as reações de PCR e *nested*-PCR para os herpesvírus de quelônios (ChHV5) (item 3.6.2.2).

3.3 Amostras clínicas

Foram coletadas amostras de tecidos tumorais, secreções oculares e de saliva de animais com e sem fibropapilomas, no período 2001-2012. A amostragem foi proveniente de 5 animais capturados em 2001; de 3 animais em 2002; de 6 animais em 2005; de 19 em 2006, de 29 em 2011 e de 6 animais em 2012.

Um total de 56 amostras de tecidos tumorais de pele, oculares e de pulmão

(fibroma), 62 amostras de secreção ocular e 51 amostras de saliva foram coletadas para análises moleculares.

Para análises histopatológicas, as amostras foram provenientes de 22 animais capturados em 2011 e 2012. Um total de 160 biópsias de tumores, sendo 154 de pele e 6 oculares, além de 3 biópsias de pele aparentemente saudável, de regiões da pele não afetadas, provenientes de 3 animais com fibropapilomatose. Amostras de tecido não tumoral (pele normal) de 9 animais, aparentemente saudáveis e sem fibropapilomas, foram colhidas e utilizadas como controles.

3.3.1 Obtenção do material clínico

A autorização para a coleta das amostras e pesquisa relacionada foi concedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio/IBAMA), do Ministério do Meio Ambiente, no. 26293-1 de 2010. A excisão cirúrgica dos tumores seguiu o procedimento realizado de rotina nas instalações do Projeto TAMAR-ICMBio, e do Aquário de Santos/SP, contudo, o manejo dos animais seguiu os procedimentos aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP) e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, números 088/2001 e 045/2011.

O pulmão do animal com fibropapilomatose foi gentilmente coletado e cedido pelo Dr. Gustavo Dutra, Médico Veterinário do Aquário de Santos/SP, e transportado congelado até o Laboratório do ICB-USP.

3.3.2 Coleta de dados biométricos

Os animais foram retirados de seus tanques e, após esgotamento da água, acomodados sobre uma mesa ou sobre o chão (dependendo do tamanho do animal). Após contenção física, os dados biométricos foram coletados de cada animal: comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), largura curvilínea da carapaça (LCC) e massa corpórea (MC).

Além desses dados, dos animais com FP, foram anotados a quantidade, o tamanho e a localização dos fibropapilomas, de acordo com a distribuição por região anatômica dos animais. Os animais que não apresentavam fibropapilomas visíveis foram considerados normais. Os fibropapilomas foram ainda classificados por tamanho, escores 1 a 4, de acordo com o método descrito por Work e Balazs (1999): 1) <1 cm; 2) $1\text{ cm} \leq \text{FP} \leq 4\text{ cm}$, 3) $4\text{ cm} < \text{FP} \leq 10\text{ cm}$ e 4) $> 10\text{ cm}$.

3.3.3 Remoções cirúrgicas dos tumores

As amostras de tumores foram removidas cirurgicamente de animais por médico veterinário. Após assepsia do local com álcool iodado foi administrada anestesia local com Lidocaína® e, após alguns minutos, realizada a incisão cirúrgica superficial do tecido tumoral com auxílio de bisturi. Nos casos que ocorreu hemorragia, devido a grande vascularização dos tumores, foram utilizadas pinças hemostáticas para estancar o sangramento. O tecido remanescente foi suturado com fio Perlon 4-0® de forma contínua ou com pontos separados. Uma nova assepsia foi realizada com água oxigenada, líquido de Dakin e Furacin® e, por último, a ferida foi recoberta por Fibrase®. Este tratamento foi mantido por 7 dias com o animal em cativeiro no tanque e, após 14 dias, a sutura foi retirada e os animais liberados para a natureza.

Figura 6 - Colheita das amostras dos tecidos tumorais dos animais com fibropapilomatose na Base do Projeto TAMAR-ICMBio de Ubatuba/SP. (A,B e C): o animal sobre a mesa em superfície de apoio. (C e D): Anestesia sendo aplicada em tumores selecionados. E: Tumor sendo removido com bisturi. F: Tumores removidos em placas de Petri: inteiro (à direita) e após fragmentação (à esquerda).

Para aumentar a possibilidade de detecção dos herpesvírus ChHV5 e permitir a caracterização histológica dos tecidos tumorais, apenas os menores tumores, que

variavam de poucos milímetros a 3 cm de diâmetro, no máximo, foram selecionados. Quando necessários, novos cortes foram realizados, com o auxílio de bisturi, sobre uma superfície de apoio, de maneira a obter fragmentos preferencialmente pequenos. As biópsias dos tecidos tumorais previamente seccionadas foram separadas em dois lotes, um para as análises histopatológicas e o outro, congeladas a -20 °C, para as análises moleculares.

3.3.4 Colheita de secreções

As secreções oculares e orais foram colhidas com swabs estéreis, acondicionadas em frascos estéreis contendo tampão fosfato 0,01 M, pH 7,6, e congeladas à -20 °C até o processamento.

Todas as amostras foram transportadas em temperatura ambiente ou sob refrigeração aos Laboratórios de Endocrinologia de Peixes do Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento e de Vírus Entéricos Humanos e Animais do Departamento de Microbiologia (ICB/USP) para análises histológicas e virais, respectivamente.

3.4 Cultura celular

3.4.1 Sistema celular utilizado

Células de linhagem estabelecida de rim de macaco verde africano, Vero, foram cultivadas em meio Eagle MME com 5 a 10% de soro fetal bovino e antibióticos visando a manutenção do herpesvírus humano Herpes Simplex Tipo-1 (HSV-1), utilizado como vírus padrão nos ensaios de padronização da reação de amplificação gênica pela polimerase (PCR).

3.4.2 Método de cultivo

As células foram mantidas em garrafas plásticas com área de 25 cm², com meio de Eagle (meio mínimo essencial), acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell-Embriolife®, Campinas, Brasil) e antibióticos (Penicilina G cristalina 100U/mL e Estreptomicina 0,1mg/mL).

O cultivo das células foi realizado em intervalos de 5 a 7 dias. Para o repique, o meio de crescimento da cultura foi decantado e, a seguir, a monocamada celular foi

lavada, por 2 vezes consecutivas, com 3 mL de solução de tripsina (1:250, Difco) a 0,25% em associação com EDTA 0,02% pH 8,0. Quando as células apresentavam-se desprendidas, foram ressuspensas em 3 mL de meio de crescimento, igual ao meio de manutenção, porém com 10% de soro fetal bovino. A seguir, esta suspensão de células foi ressuspensa em 18 mL de meio Eagle com 10% de SFB e distribuída em novas garrafas. As culturas foram, então, mantidas em posição estacionária em estufa a 37 °C.

3.4.3 Cultivo do vírus padrão HSV-1

Alíquotas de 600 µL de suspensão viral foram inoculadas em garrafas plásticas de 25 cm² contendo culturas celulares Vero previamente cultivadas de acordo com o item 4.2. Após um período de 60 minutos a 37 °C para a adsorção viral, os volumes foram completados para 6 mL, com meio de Eagle contendo 5% de soro fetal bovino. As culturas foram mantidas a 37 °C e observadas diariamente ao microscópio.

Quando as células apresentavam alterações morfológicas sugestivas de efeito citopático, ou ainda desprendimento total, estas foram rompidas através de congelamento e descongelamento a -20 °C consecutivos. Posteriormente, os vírus liberados foram submetidos a novo cultivo. Um total de três cultivos sucessivos foram realizados, sendo o último, em garrafas com área de 75 cm² visando à obtenção de 20 mL de suspensão viral. Posteriormente, visando a obtenção de grandes concentrações de DNA viral, o herpesvírus padrão foi cultivado em células Vero cultivadas em garrafas do tipo Roux. Com exceção dos volumes de inóculo e de meio de cultura utilizado, 10 mL e 90 mL, respectivamente, as condições de cultivo foram idênticas às descritas para o cultivo em garrafas de 25 cm².

3.5 Processamento dos materiais

3.5.1 Fixação dos tecidos tumorais

As frações dos tecidos obtidos com até, no máximo, 1,5 cm de diâmetro, foram fixadas por imersão em solução de Bouin, em temperatura ambiente, e metacarn, à 4 °C, no próprio local de coleta. Vinte e quatro horas após a fixação, as amostras foram transferidas para solução de álcool 70 °C e diafanizadas. Todas as amostras foram processadas de forma rotineira para inclusão em parafina e, em adição, para proporcionar cortes mais finos e melhor visualização da morfologia dos tecidos foi utilizada a resina Tecnovit® 7100 (Heraeus Kulzer, Alemanha). Os blocos foram

seccionados em micrótomo a 5 µm e 2 µm, respectivamente, de forma contínua e com espaçamento de 200 µm de distância entre cada um e montados em lâminas de vidro.

3.5.2 Suspensões dos tecidos tumorais para análises moleculares

Suspensões a 20% dos fragmentos tumorais foram preparadas em solução salina tamponada, pH 7,2, mediante trituração mecânica e congelamentos sucessivos a -70 °C. As suspensões foram homogeneizadas em agitador vortex e, a seguir, centrifugadas a 6.000 rpm durante 60 minutos à 4 °C em centrífuga Hettich® (Tuttlingen, Germany), modelo EBA 12R. Para descontaminação, dois terços do sobrenadante foram coletados, misturados com uma solução de antibióticos (Penicilina G Potássica 500 U/mL e Estreptomicina 2,5 mg/mL) e mantidos por uma hora à temperatura ambiente. As amostras foram congeladas e mantidas a -20 °C até o momento do uso.

Os fragmentos dos tecidos foram previamente seccionados, e macerados com auxílio de gral e pistilo em 2 ml de solução salina.

3.6 Métodos de detecção viral

3.6.1 Análise dos cortes histológicos por microscopia de luz

Os cortes obtidos em micrótomo comum foram corados utilizando-se o método de coloração por Hematoxilina-Eosina (HE). Um mínimo de três cortes histológicos seriais de cada biópsia foi analisado em microscopia óptica de luz, após coloração pelo método de HE.

3.6.2 Detecção viral por métodos moleculares

3.6.2.1 Extração de DNA viral dos lisados tumorais e das secreções

3.6.2.1.1 Utilizando o reagente Trizol

A extração do DNA viral, a partir das suspensões dos tecidos tumorais e das secreções obtidas no período 2001-2012 foi realizada utilizando-se TRIZOL® *Reagent* (Invitrogen 15596) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante e com pequenas modificações.

Em tubos Eppendorf® misturou-se um volume de 300 µl da suspensão dos

tecidos tumorais a 20% e 900 µl de TRIZOL[®]. A mistura foi homogeneizada levemente em agitador vortex e incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 240 µl de clorofórmio, seguido de agitação manual durante 15 segundos e incubação por 3 minutos em temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos em temperatura de 4 °C e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. À interfase, juntamente com a fase fenólica e clorofórmio, foram adicionados 300 µL de etanol absoluto, seguido de agitação manual várias vezes e incubado por 3 minutos em temperatura ambiente. A seguir, a mistura foi centrifugada a 2.500 rpm, à 4 °C, durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi lavado com 500 µL de citrato de sódio (0,1M em etanol 10%) e agitado em vortex levemente. A mistura foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, centrifugada novamente a 2.500 rpm por 5 minutos à 4 °C. Essa etapa foi repetida por duas ou três vezes, dependendo da necessidade, até que não restasse resíduo de Trizol[®] na amostra. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensionado em 1,5 mL de etanol a 75% e incubado por mais 20 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação de 2.500 rpm, à 4 °C, durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de DNA foi ressuspensionado, após secagem, em 30 µL ou 40 µL, no máximo, em solução de NaOH 8 mM ou água ultrapura Milli-Q. O DNA extraído foi mantido à -80 °C até o momento do processamento.

3.6.2.1.2 Utilizando o Kit comercial Dneasy Blood , Tissue

A extração do DNA viral a partir dos espécimes coletados no período 2010-2012 foi realizada utilizando-se, além da metodologia descrita no item 5.2.1.1, o *kit* comercial de extração *Dneasy Blood , Tissue Kit* (Qiagen[™], Valencia, California, EUA, cód. 69504) de acordo com as instruções do fabricante.

Vinte e cinco miligramas de tecido tumoral de cada amostra foram seccionados, com auxílio de bisturi, em fragmentos pequenos e transferidos para tubos Eppendorf[®]. Em seguida, foram acrescidos 180 µL de tampão ATL, além de 20 µL de proteinase K. Essa mistura foi então homogeneizada em vortex e incubada a 56 °C até a completa dissolução do tecido. Para isso, ocasionalmente a mistura foi agitada em vortex durante a incubação e, por mais 15 segundos, imediatamente antes do próximo passo.

À solução obtida foram adicionados 200 µL de tampão AL, agitado em vortex, e incubado a 56 °C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto (Merck[®]) e novamente homogeneizado em vortex. A mistura dessa solução

foi transferida para um microtubo contendo coluna de sílica e submetido à centrifugação a 6000 x g a 25 °C por 1 minuto, em centrífuga para microtubos (Hettich Eba 12R). Posteriormente, o filtrado foi descartado e a coluna de sílica foi então transferida para um tubo de coleta, acrescida de 500 µL de tampão de lavagem AW1, e submetida à centrifugação a 6000 x g a 25 °C por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para outro tubo de coleta para a adição de 500 µL do tampão de lavagem AW2, seguido de centrifugação a 20000 x g a 25 °C por 3 minutos. O filtrado foi descartado e a centrifugação repetida por mais 1 minuto para remoção de qualquer resíduo do tampão.

Ao final, foram adicionados 80 µL de tampão de eluição AE diretamente no centro da coluna de sílica, sem tocar a membrana. Após incubação a 25°C por 1 minuto, o material foi submetido à centrifugação a 6000 x g a 25 °C por 1 minuto. Para obter maior rendimento de DNA o último passo foi repetido uma última vez.

3.6.2.2 Detecção de Herpesvírus

A detecção de herpesvírus nos espécimes baseou-se na amplificação de seqüências do gene da polimerase, comum aos herpesvírus humanos e animais conforme método descrito por VanDevanter et al., (1996). Os diferentes iniciadores (*primers*) usados encontram-se descritos na Tabela 2, bem como suas seqüências de nucleotídeos, seus respectivos produtos amplificados e referências bibliográficas.

Tabela 1 - Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados para a detecção de herpesvírus, seus respectivos produtos amplificados e referências bibliográficas.

Reação	Primer	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do segmento (pb)	Referência bibliográfica
PCR	ILK KG1	TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA GTCTTGCTCACC AGNTCNACNCCYTT	708 pb	VanDevanter <i>et al.</i> , 1996
PCR	DFA KG1	GAYT TYGCNAGYYTNTAYCC GTCTTGCTCACC AGNTCNACNCCYTT	452 pb	VanDevanter <i>et al.</i> , 1996
Nested-PCR	TGV IYG	TGTAACTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT	207 pb	VanDevanter <i>et al.</i> , 1996

3.6.2.2.1 Reação de PCR

Os três *primers* de consenso ILK, DFA e KG1 foram utilizados numa reação triplex, visando uma primeira amplificação de seqüência do gene da polimerase. Para realização dessa etapa preparou-se uma mistura de reação em tampão PCR *Buffer* 10x (Biotools®) contendo 2 mM de MgCl₂, 200 µM de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs, Fermentas), 100pmoles de cada *primer*, 1U de DNA polimerase *Tth* (*Thermus thermophilus* HB-8, Biotools®, Madri, Espanha) e água ultrapura Milli-Q, em um volume final de 30 µL. Foram acrescentados a essa mistura 5 µL de DNA viral purificado. A reação de amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler® gradient* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) com desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguida de 45 ciclos de: desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 46 °C por 1 minuto e uma extensão a 72 °C por 60 segundos. A extensão final foi obtida a 72 °C por 5 minutos. Em todas as reações foram incluídas amostras de água como controle negativo. O herpes simplex Tipo 1 (HSV-1) foi amplificado concomitantemente com os *primers* de consenso para controle positivo das reações.

Os produtos amplificados pela reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Gibco, Carlsbad, Califórnia, USA) a 1,5% em tampão Tris acetato 1x (TAE; 40mM Tris-acetato, ácido acético 20 mM, EDTA 0,5M pH8,0), contendo brometo de etídeo a 5 µg/mL (Invitrogen™). A corrida eletroforética foi realizada em cuba de eletroforese horizontal, contendo tampão TAE 1x, sob tensão de 80 volts. Após a corrida eletroforética, a presença dos fragmentos foi evidenciada por exposição à luz U.V e o gel documentado em fotografias digitais utilizando o equipamento de captura de imagens Vilber Lourmat (Fotodocumentador Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, França).

3.6.2.2.2 Reação de Nested-PCR

Para confirmar a presença de herpesvírus nos espécimes foi realizado reação de *nested-PCR*, utilizando os *primers* internos TGV e IYG. Estes *primers* amplificam fragmentos de 207 pb. Em todas as reações foram incluídas amostras de água como controle negativo e o herpesvírus humano Tipo 1 (HSV-1) como controle positivo.

Para realização dessa etapa preparou-se uma mistura de reação em tampão

PCR *Buffer* 10 X (Biotools®) contendo 2 mM de MgCl₂, 200 µM de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs, Fermentas), 100 pmoles de cada *primer*, 1U de DNA polimerase *Tth* (*Thermus thermophilus* HB-8, Biotools®, Madri, Espanha) e água ultrapura Milli-Q, em um volume final de 30 µL. Foram acrescentados a essa mistura 10 µL de DNA viral purificado. A reação de amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler® gradient* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) com desnaturação inicial de 94 °C por 3 minutos, seguida de 45 ciclos de: desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 46 °C por 1 minuto e uma extensão a 72 °C por 60 segundos. A extensão final foi obtida a 72 °C por 5 minutos. Em todas as reações foram incluídas amostras de água como controle negativo e amostra do herpesvírus humano HSV-1 como controle positivo. Os produtos amplificados pela reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Gibco, Carlsbad, Califórnia, USA) a 1,5 % em tampão Tris acetato 1 X (TAE, 40 mM Tris-acetato, ácido acético 20 mM, EDTA 0,5M pH8,0), contendo brometo de etídeo a 5 µg/mL (Invitrogen™). A corrida eletroforética foi realizada em cuba de eletroforese horizontal, contendo tampão TAE 1x, sob tensão de 80 volts. Após a corrida eletroforética, a presença dos fragmentos foi evidenciada por exposição à luz U.V e o gel documentado em fotografias digitais utilizando o equipamento de captura de imagens Vilber Lourmat (Fotodocumentador Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, França).

3.6.2.3 Detecção dos herpesvírus de quelônio Tipo 5 (ChHV5)

3.6.2.3.1 Reação de PCR

A detecção do *Chelonid herpesvirus 5* nos espécimes baseou-se na amplificação de sequências parciais do gene da polimerase usando os métodos de PCR e *nested*-PCR. A padronização dessas reações foi realizada de acordo com os protocolos descritos por LU et al., (2000). Em todas as reações foram incluídas amostras de água como controle negativo. Como controle positivo, um total de 3 amostras positivas para herpesvírus, previamente testadas, foram submetidas nos ensaios de padronização.

Os diferentes iniciadores (*primers*) usados para a detecção dos ChHV5 encontram-se descritos na Tabela 1, bem como suas sequências de nucleotídeos, seus respectivos produtos amplificados e referências bibliográficas. Estes *primers*

foram utilizados em substituição aos descritos por VanDevanter et. al., (1996), pois são específicos para o vírus em questão.

Tabela 2 - Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados para a detecção dos CFPHV, seus respectivos produtos amplificados e referências bibliográficas.

Reação	Primer	Posição nt	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do segmento (pb)	Referência bibliográfica
PCR	LU - 1 LU - 2	86416-86861	AGCATCATCCAGGCCCAATCT CGGCCAGTCCGGCGCGTCGACCA	445 pb	Lu et al., 2000
Nested-PCR	LUN -1 LUN -2	86576-86782	CTGCTGACCGACTGGCTGGC AGCATGTCGCGCCCTACGGTGGTGA	206 pb	Lu et al., 2000

Para realização da primeira amplificação preparou-se uma mistura de reação em tampão PCR *Buffer* 10x (Biotools®) contendo 2 mM de MgCl₂, 200 µM de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs, Fermentas), 10 pmoles de cada *primer*, 1U de DNA polimerase *Tth* (*Thermus thermophilus* HB-8, Biotools®, Madri, Espanha) e água ultrapura Milli-Q, em um volume final de 25 µL. Foram acrescentados a essa mistura 10 µL de DNA viral purificado. A reação de amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler® gradient* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) com desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos de: desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 30 segundos e uma extensão a 72 °C por 60 segundos. A extensão final foi obtida a 72 °C por 7 minutos. Em todas as reações foram incluídas amostras de água como controle negativo.

Os produtos amplificados pela reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Gibco, Carlsbad, Califórnia, USA) a 1,5% em tampão Tris acetato 1 X (TAE; 40mM Tris-acetato, ácido acético 20 mM, EDTA 0,5M pH8,0), contendo brometo de etídeo a 5 µg/mL (Invitrogen™). A corrida eletroforética foi realizada em cuba de eletroforese horizontal, contendo tampão TAE 1 X, sob tensão de 80 volts. Após a corrida eletroforética, a presença dos fragmentos foi evidenciada por exposição à luz U.V e o gel documentado em fotografias digitais utilizando o equipamento de captura de imagens Vilber Lourmat (Fotodocumentador Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, França).

3.6.2.3.2 Reação de Nested-PCR

Para confirmar a especificidade da PCR foi realizada a *nested*-PCR seguindo parâmetros descritos por LU et al., (2000). Nesta reação foi utilizada a mesma concentração de sais e estrigência apresentadas na PCR (item 3.6.2.3.1), com exceção dos oligonucleotídeos. Na *nested*-PCR foram utilizados os oligonucleotídeos LUN-1 e LUN-2 com concentração de 10 pmoles cada. À esta mistura de reagentes foi adicionado 5 µL do produto da primeira amplificação e a reação realizada em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf®) com desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos de: desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 30 segundos e uma extensão a 72 °C por 60 segundos. A extensão final foi obtida a 72 °C por 7 minutos. Em todas as reações foi utilizado como controle positivo DNA de ChHV5 e, como controle negativo, água ultrapura (MilliQ®).

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em condições idênticas às descritas no item anterior, e posteriormente corados com solução de brometo de etídio (5 µg/ml). A presença das bandas foi evidenciada após exposição à luz UV e o gel documentado em fotografias digitais utilizando o equipamento de captura de imagens Vilber Lourmat (Fotodocumentador Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, França).

3.6.2.4 Sequenciamento gênico

Para tipagem dos ChHV5 detectados foram submetidas ao sequenciamento gênico somente as amostras que apresentaram os produtos amplificados, visíveis em gel de agarose, após a reação de PCR.

3.6.2.4.1 Extração do DNA para o sequenciamento

Os fragmentos de interesse foram purificados utilizando-se a exonuclease EXOSAP-IT® (USB Corporation, Ohio, USA, GE cat. 78200) para a remoção de excesso de reagentes que pudessem interferir na reação de sequenciamento, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A cada 5µL de produto de PCR obtido acrescentou-se 2 µL da enzima. Em seguida, os tubos foram acondicionados no termociclador *Mastercycler® gradient* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) em um programa cuja ciclagem foi de 15 minutos a 37 °C, para a ação enzimática, seguido de 15 minutos a 80 °C para a inativação da enzima.

Após a purificação, o volume final de 14 µL de solução de DNA obtida foi estocado a -80 °C até o momento da reação de sequenciamento.

A concentração do DNA purificado de cada amostra foi determinada através da comparação com um padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*® (Invitrogen Cat. 10068). Foram aplicados, em gel de agarose a 1,5 %, com brometo de etídeo (5 mg/mL), 2 µL de DNA purificado e 4 µL do padrão de peso molecular. Após corrida eletroforética, o gel foi visualizado em transiluminador com luz UV e fotografado.

A comparação foi realizada baseada na intensidade das bandas obtidas da amostra frente à intensidade das bandas do padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*®, cuja quantidade de DNA, em nanogramas (ng), é definida e fornecida pelo fabricante. Feita a comparação, foi possível definir a concentração de DNA viral de cada amostra.

3.6.2.4.2 Reação de Sequenciamento

Para a realização da reação de sequenciamento, as amostras do estudo, cujas concentrações de DNA possuíam ≥ 20 ng, foram encaminhadas para o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. Em tubos eppendorf®, 5 µL de cada amostra, eluídos em água ultrapura Milli-Q, contendo 20 ng/µL de DNA, foram acrescidos de 2,5 µL de cada *primer* específico, *foward* e *reverse*, em concentração de 5 pmoles, respectivamente, em tubos individuais, e transportadas sob-refrigeração.

Para a reação de sequenciamento automático foi utilizado o *BigDye*® *Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem cat. 4337456), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram sequenciadas utilizando o sistema de análise de DNA de 96 capilares. Para cada reação, a mistura dos reagentes foi composta de 2 µL de *BigDye*®, 1 µL do tampão, 1 µL de cada primer (5 pmoles), 2 µL do produto de PCR (40 ng) e 4 µL de água ultrapura, totalizando 10 µL. A reação de amplificação foi realizada em termociclador PTC200 MJ Research® (Bio-Rad, Minnesota, USA) com programa de desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de: desnaturação a 96 °C por 10 segundos; anelamento a 50 °C por 5 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos.

Após a reação de sequenciamento, os produtos foram purificados em placas Multiscreen HV (Millipore®, cód. MAHVN4550) contendo Sephadex™ G-50 (GE Healthcare, cód. 17-0573-02) a fim de remover incorporações do *kit* de sequenciamento e sais.

Na etapa final os produtos obtidos foram aplicados no analisador automático de DNA modelo ABI 3730 (DNA Analyzer®- Applied Biosystems) e os resultados gerados foram gravados em arquivos individuais para posterior análise.

3.6.2.4.3 Edição e análise das reações do sequenciamento

O alinhamento das sequências de nucleotídeos obtidas foi realizado com o auxílio dos programas *BioEdit*, (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) e *Ugene* usando o algoritmo Muscle v3.8.31 (Edgar, 2004).

As sequências foram analisadas e comparadas com as já descritas e depositadas no *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda), com o uso do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul et al., 1997) por meio da internet.

A dedução das sequências de aminoácidos foi realizada por meio dos programas *BioEdit*, *Mega* e *Ugene* após o alinhamento inicial de todas as sequências do presente estudo. Em seguida, todas as sequências de aminoácidos foram novamente alinhadas e analisadas.

3.6.2.4.4 Reconstruções filogenéticas

Para verificar as relações filogenéticas as árvores filogenéticas foram construídas baseando-se na comparação das sequências de nucleotídeos obtidas entre si e, em adição, com as sequências obtidas no *GenBank*, através do método Máxima Verossimilhança (ML) com os parâmetros indicados pelo programa *jModelTest* v. 3.7 (Darriba et al., 2012). As sequências de nucleotídeos padrões usadas para essa comparação estão descritas na Tabela 3, com seus respectivos registros de depósito no *Genbank*, procedências e referências bibliográficas.

Para determinar o melhor modelo para a inferência filogenética utilizou-se o modelo *General Time Reversible* (GTR)+G+I usando o programa *Garli* v2.0.1 (Zwickl, 2006). A consistência da filogenia foi analisada através de valores de *bootstrap*, com 1000 réplicas.

As sequências de nucleotídeos obtidas neste estudo foram depositadas no *GenBank*.

Tabela 3 - Amostras de referência usadas para comparação e para as análises filogenéticas no presente estudo. Os números de depósito do *Genbank* das amostras e as respectivas procedências, espécies e referências bibliográficas.

N° Genbank	Procedência	Espécie	Referência Bibliográfica
AY646888	FL	cc	Ene et al. (2005)
AY646889	FL	cc	Ene et al. (2005)
AY646890	FL	cc	Ene et al. (2005)
AY646891	FL	cm	Ene et al. (2005)
AY646892	FL	cm	Ene et al. (2005)
AY646894	FL	lk	Ene et al. (2005)
AF035004	FL	cm	Quackenbush et al. (1998)
AF299107	AUS	cc	Quackenbush et al. (2001)
AF299108	AUS	cm	Quackenbush et al. (2001)
AF299110	BRB	cm	Quackenbush et al. (2001)
AF049904	CR	lo	Quackenbush et al. (1998)
AY646893	HW	cm	Herbst et al. (2004)
AY390420	HW	cm	Greenblatt et al. (2005)
AF299109	MEX	lo	Quackenbush et al. (2001)
AY390422	SD	cm	Greenblatt et al. (2005).
HQ000007	GG	cm	Duarte et al. (2012)
HQ000006	GG	cm	Duarte et al. (2012)
HM 348895	GG	cm	Duarte et al. (2012)
HM 348896	GG	cm	Duarte et al. (2012)
HM 348897	GG	cm	Duarte et al. (2012)
HM 348898	GG	cm	Duarte et al. (2012)
AY390421	PR	cm	Greenblatt et al. (2005)
AY395516	PR	cm	Greenblatt et al. (2005)
JN580279	PR	cm	Patrício et al. (2012)
JN580280	PR	cm	Patrício et al. (2012)
JN580281	PR	cm	Patrício et al. (2012)
JN580282	PR	cm	Patrício et al. (2012)
JN580283	PR	cm	Patrício et al. (2012)
JN580284	PR	cm	Patrício et al. (2012)
JN938584	BR-SP	cm	Rodenbusch et al. (2014)
JN938585	BR-SP	cm	Rodenbusch et al. (2014)
JN938586	BR-ES	cm	Rodenbusch et al. (2014)
JN938587	BR-SP	cm	Rodenbusch et al. (2014)
JN938589	BR-CE	cm	Rodenbusch et al. (2014)
JN938588	BR-BA	cm	Rodenbusch et al. (2014)

Cc: *Caretta caretta*; Cm: *Chelonia mydas*; Lk: *Lepidochelys kempii*; Lo: *Lepidochelys olivacea*.

Austrália (AUS), Barbados (BRB), Costa Rica (CR), Flórida (FL), Havaí (HW), México (MEX), San Diego (SD), Porto Rico, Golfo da Guiné (GG) e os estados brasileiros do Ceará (CE), Bahia (BA), Espírito Santo (ES) e São Paulo (SP).

4 RESULTADOS

Tabela 4 - Amostras de pele, saliva, secreção ocular e de tumores de pele, de olho e de pulmão coletados de tartarugas verdes com e sem FP durante o período de 2001-2012 na região sudeste do Brasil.

4.1 Caracterização das amostras obtidas

Os registros e procedências das amostras coletadas ao longo do período de 2001-2012 são apresentados na Tabela 4.

DADOS DOS ANIMAIS					NÚMERO DA AMOSTRA					
ANO	Registro ICB	Macroscopia	Procedência	Data de coleta	ANÁLISES MOLECULARES				ANÁLISES HISTOLÓGICAS	
					Pele normal	Saliva	Secreção ocular	Tumor de pele	Tumor de olho	Biópsias
2001	R39.01	FP	Ubatuba SP	13.02.01				1		
	R44.01	FP	Ubatuba SP	13.02.01	2		3	4		
	R45.01	FP	Ubatuba SP	13.02.01	5		6	7		
	R46.01	FP	Ubatuba SP	13.02.01	8		9	10		
	R48.01	Normal	Ubatuba SP	13.02.01	11					
2002	R01.02	FP	Ubatuba SP	19.03.02			12, 13, 14			
	R02.02	FP	Ubatuba SP	19.03.02			15			
	R03.02	FP	Ubatuba SP	19.03.02	16		17			
2005	R01.05	Normal	Ubatuba SP	23.08.05	21		22			
	R02.05	FP	Ubatuba SP	23.08.05	23		24	34		
	R03.05	FP	Ubatuba SP	23.08.05	25		26 (od), 27 (oe)	27		
	R04.05	FP	Ubatuba SP	23.08.05	28		29 (od), 30 (oe)	36		
	R05.05*	FP	Ubatuba SP	23.08.05	31		32 (od), 33 (oe)	37		
			recaptura	13.02..06			60	66		
			recaptura	29.03.06			86	90		
2006	R06.05*	FP	Ubatuba SP	29.03.06	81		85	89, 89a		
			recaptura	13.02..06			59	65		
	R01.06	FP	Ubatuba SP	13.02.06	58			67		
	R02.06	FP	Ubatuba SP	13.02.06			61	68		
	R03.06	FP	Ubatuba SP	13.02.06			62, 63	69		
	R04.06	FP	Ubatuba SP	13.02.06			64	70		
	R05.06	FP	Ubatuba SP	29.03.06	83		87	91	91a	
	R06.06	FP	Ubatuba SP	29.03.06	84		88	92		
	R07.06	FP	Ubatuba SP	26.04.06	102		104	106		
	R08.06	FP	Ubatuba SP	26.04.06	103		105	107p, 108g	109	
	R09.06	FP	Ubatuba SP	24.05.06	124		126	128g, 129p		
	R10.06	FP	Ubatuba SP	24.05.06	125		127	130, 131		
	R16.06	FP	Ubatuba SP	22.06.06	142		143	147		
	R17.06	FP	Ubatuba SP	22.06.06	144		145	148, 149		
	R18.06	FP	Ubatuba SP	04.09.06	165		166			
	R19.06	FP	Ubatuba SP	04.09.06	168		169	170, 171		
2011	R20.06*	FP	Ubatuba SP	22.06.06	140		141	146		
			recaptura	04.09.06	173		174	175		
	R22.06	FP	Ubatuba SP	11.06	189		190			
	R23.06	FP	Ubatuba SP	11.06			193			
	R01.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	1		2			4
	R02.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	7		8	5		11
	R03.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	12		13	16		15
	R04.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	17		18			
	R05.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	20		21	23		22
	R06.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	31		32	25		
	R07.11	Normal	Ubatuba SP	24.02.11	26		27			
	R08.11	Normal	Ubatuba SP	24.02.11	28		29			
	R09.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	31		32	38		34, 35, 36, 37
	R10.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	39		40	53g, 55g, 56g, 57p, 58		42, 43, 44, 45, 45, 47
	R11.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	60		61	69g, 70		63, 64, 65, 65b
	R12.11	Normal	Ubatuba SP	24.02.11	71		72			
	R13.11	Normal	Ubatuba SP	24.02.11	73		74			
	R14.11	Normal	Ubatuba SP	24.02.11	76		77			
	R15.11	Normal	Ubatuba SP	24.02.11	79		80			
	R16.11	Normal	Ubatuba SP	24.02.11	82		83			
2012	R17.11*	FP	Ubatuba SP	10.05.11	85		86	102, 103		88(to), 89(to), 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97
			recaptura	29.08.11	135		136	134		138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145
	R18.11	FP	Ubatuba SP	10.05.11	104		105	119		106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116
	R19.11	FP	Ubatuba SP	10.05.11	121		122	133		123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130
	R20.11	Normal	Ubatuba SP	10.05.11	134a		134b			
	R21.11	FP	Ubatuba SP	29.08.11	148		149	161b		151, 152, 153, 154, 155, 156, 159
	R22.11	FP	Ubatuba SP	29.08.11	163		164	162		166, 167, 168, 169, 170
	R23.11	Normal	Ubatuba SP	29.08.11						172, 173, 174
	R24.11	Normal	Santos SP	10.12						175, 176
	R25.11	Normal	Santos SP	10.12						177
	R26.11	Normal	Santos SP	10.12						178
	R27.11	Normal	Santos SP	10.12						179
2012	R01.12	Normal	Ubatuba SP	19.04.12	180		181			183, 184, 185, 186
	R02.12	FP	Ubatuba SP	19.04.12	187,		187"	196		189, 190, 191 (pn), 192, 193, 194 (pn)
	R03.12	FP	Ubatuba SP	19.04.12	197		198	206		200, 201 (pn), 202, 203 (pn)
	R04.12	FP	Ubatuba SP	19.04.12	207		208	219		210, 211, 212, 213 (pn), 214, 215, 216 (pn)
	R05.12	FP	Ubatuba SP	19.04.12	220		221	231		223, 224, 225 (pn), 226, 227, 228 (pn)
	R06.12	FP	Ubatuba SP	19.04.12	232		233	240		235, 236 (pn), 237, 238 (pn)
	R07.12	Normal	Ubatuba SP	19.04.12						242, 243, 244, 245, 246, 247
TOTAL					1	53	67	56	3	3
										número
										114

pn: pele normal; od: olho direito; oe: olho esquerdo; * animais capturados em mais de uma ocasião; p: tumor pequeno (≤ 1 cm); g: tumor grande ($\geq 1,1$ cm); As áreas hachuradas; amostras não obtidas.

4.2 Biometria dos animais

A biometria dos animais normais e com fibropapilomatose coletados no período do estudo é apresentada nas Figuras 7 e 8 que compreendem os dados de comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), largura curvilínea da carapaça (LCC), em cm, e a respectiva massa corporal (MC), em Kg, de cada animal.

Entre os animais normais as medidas de CCC, LCC e MC variaram de 30-67,6 cm, 27,3-63,5 cm e 2,5-29 Kg, respectivamente. Os animais acometidos apresentaram medidas que variaram de 33,5-68,5 (CCC), 31,0-63,0 cm (LCC) e de 4,0-35,0 Kg de massa corporal, conforme mostra o anexo A.

Todos os animais do estudo eram juvenis. O sexo de cada animal não pode ser determinado em razão da provável idade presumida a partir dos dados coletados de biometria.

Dezoito animais não puderam ser nem medidos e nem pesados.

Figura 7 - Biometria de animais normais coletados no período 2005-2012. Os dados de comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), largura curvilínea da carapaça (LCC) e a respectiva massa corporal (MC), em Kg, de cada animal estão apresentados.

Figura 8 - Biometria de animais com fibropapilomatose coletados no período 2005-2012. Os dados de comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), largura curvilínea da carapaça (LCC) e a respectiva massa corporal (MC), em Kg, de cada animal estão apresentados.

4.3 Análise dos tumores

Um total de 1324 tumores, provenientes de 36 animais, foram quantificados e classificados. A tabela 5 apresenta o número de tumores encontrados nos animais acometidos segundo os escores de 1 a 4, em centímetros, padronizados por Work e Balazs (1999), do período 2005-2012. O número total de tumores por animal variou de 2 a 129.

Por se tratar de amostragem de um período prolongado, aproximadamente dez anos, a contagem e classificação dos tumores de todos os animais do estudo não puderam ser realizadas, como é o caso do período de 2001-2002. A contagem e análise dos tumores de animais não puderam ser realizadas, pois os tumores foram removidos parcialmente e anteriormente ao dia da coleta pelos profissionais do Projeto TAMAR.

Do total de tumores analisados, 771 (58,2%) foram classificados como escore 2, seguidos por 511 (38,6%) como escore 1, 36 (2,7%) como escore 3, e apenas 6 (0,5%) tumores maiores que dez centímetros (escore 4), como mostra a Figura 9.

Tabela 5 - Número de tumores encontrados por animal analisado, classificados segundo os escores 1 a 4 (Work e Balazs, 1999): 1) <1 cm; 2) 1cm ≤FP≤ 4cm; 3) 4cm<FP≤10 cm; 4) > 10 cm.

Animais	Nº de Tumores				Total
	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Escore 4	
R02.05	32	50	1	1	84
R05.05	5	15	3	0	23
R06.05	15	45	3	0	63
R01.06	4	1	0	0	5
R02.06	6	24	3	0	33
R03.06	9	56	1	0	66
R04.06	0	13	0	0	13
R05.06	5	32	1	0	38
R06.06	7	30	2	0	39
R07.06	60	44	2	0	106
R08.06	13	19	2	0	34
R09.06	10	20	0	0	30
R10.06	3	13	0	0	16
R15.06	3	1	0	0	4
R16.06	4	33	0	0	37
R17.06	9	8	0	0	17
R18.06	16	40	0	0	56
R19.06	101	28	0	0	129
R20.06	16	20	0	0	36
R22.06	19	48	2	1	70
R23.06	1	0	1	0	2
R24.06	43	35	0	0	78
R01.11	11	26	0	0	37
R02.11	2	2	0	0	4
R03.11	8	24	1	0	33
R04.11	5	3	0	0	8
R09.11	0	2	0	0	2
R10.11	17	25	0	0	42
R11.11	32	17	0	0	49
R17.11	8	20	11	2	41
R18.11	4	11	0	2	17
R02.12	6	17	0	0	23
R03.12	2	7	0	0	9
R04.12	6	11	1	0	18
R05.12	26	31	2	0	59
R06.12	3	0	0	0	3
N=	511	771	36	6	1324

Figura 9 - Frequência dos tumores encontrados nos animais analisados de acordo com os escores (1-4) observados.

4.4 Métodos de detecção viral

4.4.1 Análise histológica

4.4.1.1 Amostras obtidas

As amostras selecionadas para as análises histológicas foram provenientes de tartarugas verdes capturadas no período 2011-2012. De um total de 22 animais, 5 não apresentavam tumores e 17 tinham tumores de pele distribuídos em diversas áreas do corpo.

Macroscopicamente, os tumores de pele tinham aspecto que variava de liso a verrucoso, macio a rígido, sésil ou pedunculado e podiam apresentavam coloração esbranquiçada, enegrecida e/ou rósea, como mostra a Figura 10 (A-F). Muitos tumores estavam visivelmente parasitados (Figura 10A-C) e algumas formações com áreas aparentemente degeneradas. Os animais selecionados apresentaram tumores de pele que variavam de ≤ 1 a ≥ 10 cm de diâmetro.

Os tumores oculares eram verrucosos, geralmente multinodulares, pedunculados ou sésseis e de consistência macia. Quanto às tonalidades, frequentemente variavam de acinzentados a enegrecidos e, em alguns casos, apresentaram concomitantemente áreas despigmentadas. Alguns tumores partiam da conjuntiva, da córnea ou da junção mucocutânea das pálpebras estendendo-se para o exterior e cobrindo parcialmente ou integralmente a córnea dos animais (Figura 10G, H). Os tumores oculares dos sete animais analisados variaram de ≤ 1 a ≤ 4 cm em diâmetro. Todos os animais com FP oculares apresentaram tumores bilaterais.

Figura 10 - (A-F) Tumores encontrados na pele dos animais acometidos. (A-B) Tumores verrucosos em nadadeiras posteriores. Em (B) notam-se duas massas tumorais de pequena e média dimensões, enegrecida (à direita) e esbranquiçada (à esquerda); (C-E) grandes massas tumorais, enegrecidas, despigmentadas e róseas, em nadadeiras anteriores e pele adjacente. Em D e E, evidente presença de parasitas; (F) Quatro massas tumorais no plastrão, além de ovos de parasitas e tumores nas nadadeiras posteriores e pele adjacente; (G-H) Tumores oculares de dois animais. Em (G) Uma massa tumoral despigmentada partindo da pálpebra superior do olho do animal em direção ao exterior, além de duas massas enegrecidas oculares e grandes massas tumorais partindo do pescoço e nadadeira do animal. (H) Duas massas tumorais verrucosas enegrecidas, de diâmetros desiguais, recobrem parcialmente o olho do animal, o de menor diâmetro parte da junção mucocutânea das pálpebras. Fotografado por Telma A. Monezi.

Os fibromas foram provenientes do pulmão de um único animal. O órgão infectado possuía três tipos de massas tumorais com dimensões variadas: numerosos nódulos de poucos milímetros à aproximadamente 1 cm, distribuídos por todo o órgão; nódulos medianos esparsos, entre 1 a 5 cm de diâmetro, e 4 grandes massas tumorais que variavam de 5 a 7 cm de diâmetro, conforme mostra a Figura 11. Três dessas massas foram removidas assepticamente do órgão e processadas para as análises moleculares, 2 fibromas pequenos e 1 fibroma mediano (Figura 11F).

Figura 11 - Pulmão de animal proveniente de Santos, estado de São Paulo, com fibromas de diferentes dimensões distribuídos por todo o órgão. (A) e (B) lado direito e esquerdo do órgão, respectivamente. (C) Maior massa tumoral encontrada apontada por seta. (D) Fibroma mediano sendo removido assepticamente. (E) Áreas do pulmão após remoção de fibromas (setas). (F) Três massas tumorais selecionadas para as análises moleculares sobre placa de petri. Fotografado por Telma A. Monezi e Elizabeth M. Moura.

Figura 12 - Frequência de tumores encontrados por região anatômica dos animais analisados.

4.4.1.3 Análise dos cortes histológicos por microscopia de luz

Um total de 160 fragmentos de biópsias foi analisado. Um mínimo de três cortes histológicos seriais de cada fragmento foi analisado em microscopia óptica, após coloração pelo método de HE, totalizando 360 cortes.

Foram processados tumores da pele com, no máximo, 1,5 cm de diâmetro, de 17 animais com fibropapilomas; pele normal de cinco animais sem fibropapilomas e, em adição, biópsias de pele aparentemente normal de três animais com fibropapilomas, de regiões da pele não afetadas. De 1 a 23 biópsias de pele foram coletadas de cada animal e 4 biópsias de tumores oculares de dois animais. Ambos os animais que apresentavam tumores oculares tinham tumores bilaterais, possuindo 2 tumores em cada olho.

As principais características histopatológicas observadas nas biópsias de pele e oculares dos animais, com e sem fibropapilomatose, estão sumarizadas na Tabela 7 e a respectiva frequência relativa encontrada na Tabela 8.

Os cortes histológicos das biópsias de pele dos animais com e sem fibropapilomas, com as principais características encontradas estão mostrados na Figura 13.

Tabela 7 - Principais características histopatológicas observadas nas biópsias de pele e oculares de animais com e sem fibropapilomatose, em pelo menos um do total de cortes histológicos examinados de cada animal, coletadas em 2011 e 2012 no litoral norte do estado de São Paulo.

Registro dos animais	Fibropapilomas (FP)	Tumores	Biópsias	Hiperqueratose	Inclusão córnea	Hiperplasia da epiderme	Proliferação da derme	Cleft	Degeneração celular	Infiltração de células	Núcleos circundados por halo	Ballooning /Corpúsculo de inclusão	Discariose	Outros patógenos	Papiloma	Fibropapiloma
T02.11	Com FP	Pele	1			X	X			X	X			X		X
T03.11	Com FP	Pele	1	X		X	X			X		X				X
T05.11	Com FP	Pele	1	X	X	X	X		X	X	X			X		X
T09.11	Com FP	Pele	3	X		X	X	X	X	X	X		X			X
T10.11	Com FP	Pele	8	X	X	X	X		X	X		X	X	X		X
	Com FP	Conjuntiva	2			X	X			X	X		X	X		X
T11.11	Com FP	Pele	5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
T17.11	Com FP	Pele	6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Com FP	Conjuntiva	4	X	X	X	X	X	X	X	X		X			X
T18.11	Com FP	Pele	11	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X		X
T19.11	Com FP	Pele	3	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
T20.11	Sem FP	Pele	1	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
T21.11	Com FP	Pele	18	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
T22.11	Com FP	Pele	20	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
T24.11	Sem FP	Pele	1	X		X				X	X		X		X	
T26.11	Sem FP	Pele	5	X		X					X		X		X	
T27.11	Sem FP	Pele	4			X					X		X		X	
T01.12	Sem FP	Pele	14	X		X			X	X	X		X	X	X	
T02.12	Com FP	Pele	2	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X
T03.12	Com FP	Pele	6	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X	X
T04.12	Com FP	Pele	5	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X
		PN*				X				X	X					
T05.12	Com FP	Pele	11	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
		PN*		X	X	X	X	X	X	X	X		X		X	
T06.12	Com FP	Pele	4	X	X	X		X		X	X		X		X	
		PN*		X		X				X	X		X		X	
T07.12	Sem FP	Pele	1	X			X				X				X	
N=22			160	20	13	21	17	12	14	19	17	6	17	13	7	9

Tabela 8 - Frequências relativas das principais características histopatológicas observadas nas biópsias de pele e oculares de animais com e sem fibropapilomatose do presente estudo.

Características	Frequência Relativa %		
	Com FP	Sem FP	Total
	N=17	N=5	
Hiperqueratose	72,7	18,2	90,9
Inclusão córnea	59,2	0	59,2
Hiperplasia da epiderme	77,3	18,2	95,5
Proliferação da derme	72,7	4,5	77,3
<i>Cleft</i>	54,5	0	54,5
Degeneração celular	59,1	4,5	63,6
Infiltração de células	77,3	9,1	86,4
Núcleos circundados por halo	54,5	0	54,5
<i>Balloning</i> /Corpúsculo de inclusão	40,9	0	40,9
Discariose	59,1	18,2	77,3
Outros patógenos	54,5	4,5	59,1
Papiloma	31,8	0	31,8
Fibropapiloma	40,9	0	40,9

4.4.1.3.1 Pele Normal

Das cinco amostras de pele de animais sem FP examinadas, apenas 1 amostra não apresentou alterações histopatológicas. O epitélio estratificado escamoso apresentou, no máximo, 7 camadas de células, recoberto por fina camada queratinizada e sob a qual se observou a derme composta de camada papilar com colágeno, pequenos vasos sanguíneos e células mononucleares. Na camada reticular subjacente, largos feixes de colágeno e proliferação de fibroblastos foram visualizados (Figura 13A e B). A pele de 18,2% de animais aparentemente saudáveis apresentaram hiperqueratose e hiperplasia da epiderme. A biópsia de pele de um animal (4,5%) apresentou, além de degeneração celular, infiltração de células mononucleares, discariose e presença de patógeno.

4.4.1.3.2 Características comuns aos tumores de pele e oculares

Os tecidos tumorais foram caracterizados como papilomas (31,8%) ou fibropapilomas (40,9%) de acordo com o grau de proliferação da epiderme e da derme, respectivamente. Oito animais apresentaram os dois tipos de lesões.

Figura 13 - (A-B) Cortes histológicos de pele de animais sem FP. (A) Epiderme fina e derme e sem alterações (50X); (B) Epiderme com quatro camadas de células e camada reticular subjacente com largos feixes de colágeno evidentes (400X). (C-H) Cortes histológicos de fibropapilomas de tartarugas marinhas. (C) Típica proliferação papilar da epiderme em forma de *arborizing* (50X); (D) Epiderme hiperplásica com degeneração de células balonizantes (100X); (E) Derme espessa por exacerbada quantidade de tecido conjuntivo (50X); (F) Presença de fibroblastos dispersos na derme espessa; (G) Hiperplasia da epiderme e derme espessa com infiltrações de células na camada reticular (100X); (H) Evidentes feixes de colágeno da derme com infiltrados mononucleares (200X); (I-J) Epiderme hiperplásica com corpúsculos de inclusões, apontados por setas, no interior de células balonizantes, com hiperqueratose nas camadas sobrejacentes à epiderme. Coloração hematoxilina-eosina.

As biópsias frequentemente apresentavam aspecto típico de proliferação papilar bastante arborizada com matriz fibrovascular subjacente, como mostra a Figura 13 (C e E).

A epiderme mostrou-se frequentemente hiperplásica, alcançando 95,5% dos cortes analisados como mostra a Figura 13 (C, D, G, I e J), e raramente normal. Em 90,9% dos casos apresentou hiperqueratose ortoqueratótica (Figura 8I e J). Sob a epiderme, 77,3% das amostras apresentaram exacerbada quantidade de tecido conjuntivo resultando no espessamento da derme (Figura 13E e F), muitas vezes, ricamente vascularizada, com presença de inclusão cornificada em 59,2% dos cortes. Todos os tumores apresentaram fibroblastos em quantidades variadas e dispersos na derme papilar.

Dez animais, 45,45%, apresentaram lesões proliferativas de células epiteliais com degeneração característica de células em formato de *balloning*, cujos núcleos aumentados continham corpúsculo de inclusão intranuclear (CII), sugestivo de infecção viral (Figura 13I e J). As áreas com células balonizantes geralmente restringiram-se à focos e os CIIs estavam frequentemente envolvidos por halo claro, conforme mostra a Figura 14 (A-C).

Figura 14 - Cortes histológicos de fibropapilomas de distintos animais (A-C). Evidente foco de áreas balonizantes apontada por seta (A) em menor aumento e a respectiva área em aumentos maiores, com presença evidente de corpúsculos de inclusão circundados por halo claro no interior dos núcleos das células infectadas (B-C). Coloração H&E.

Em 86,4% das biópsias analisadas foi visualizada de moderada a densa infiltração de células inflamatórias (Figura 13G e H; Figura 15A-D). Frequentemente esses infiltrados eram perivasculares ou distribuíam-se na derme como aglomerados de células e/ou isoladamente dispersos. Em menor frequência, foram vistos próximos à área limítrofe entre derme e epiderme e, em raras exceções, na epiderme. Em

alguns casos (54,5%), fendas foram observadas entre as camadas da epiderme e derme.

Em 63,6% dos casos, áreas com intensa inflamação e ulceração (Figura 10 A-E) foram observadas, resultando em degeneração celular severa e evidente, geralmente na camada basal do epitélio. Essas áreas foram observadas em biópsias de pele (Figura 15C, D e E) e oculares (Figura 15 A, B e F) de animais acometidos, e em biópsia de pele de um animal normal (4,5%). Em alguns cortes também foi observada infiltração granulocítica formando uma pústula intraepidérmica, como mostra a Figura 15 (B e C).

Embora não tenha sido possível realizar uma identificação precisa de todos os tipos celulares desses infiltrados, principalmente nos cortes com 5µm de espessura, alguns tipos celulares foram distinguidos uns dos outros, como é o caso de linfócitos e de heterófilos. A Figura 16 mostra a distribuição dessas células em tumores de pele e oculares de um animal acometido. Normalmente os heterófilos foram vistos dispersos na derme (Figura 16C e D), ou próximos aos vasos sanguíneos (Figura 16B), tanto nos tumores de pele como nos tumores oculares. Os evidentes e característicos grânulos eosinofílicos foram visualizados, principalmente nos cortes ultrafinos (2µm de espessura), permitindo assim sua identificação (Figura 16D). Os linfócitos, semelhantes aos linfócitos humanos, eram as menores células desses infiltrados e com intensa marcação basofílica (Figura 16E e F).

Algumas áreas do estroma tumoral apresentavam células pigmentadas com grânulos cuja coloração variava do marrom ao castanho, identificados como melanomacrófagos (Figura 16E).

A presença de outros patógenos também foi observada em biópsias de treze animais. Muito embora uma identificação desses possíveis patógenos não tenha sido realizada, a presença de estruturas ovaladas e acastanhadas foram visualizadas, sendo sugestivas de ovos de trematódeos, como relatado por outros autores. Normalmente essas estruturas eram circundadas por camadas de células gigantes multinucleadas, estando ou não acompanhadas pela presença de células inflamatórias.

A pele aparentemente normal de animais com FP, porém de áreas aparentemente saudáveis, também apresentaram alterações histopatológicas quando examinadas ao microscópio, inclusive com a presença de células em *balloning* e corpúsculo de inclusão intranuclear, sugestivo de infecção viral.

Figura 15 - (A-F) Áreas com intensa inflamação e ulceração observadas em FP de pele e ocular de animais acometidos. (A) Células mononucleares inflamatórias próximas à camada basal epidérmica (seta), além de infiltrados na derme; (B) Pústula evidente no ápice de uma das papilas de tumor ocular, entre a camada mais externa da epiderme e camada hiperqueratótica; (C e D) Intensa infiltração de células mononucleares entre a epiderme e derme (setas), além da presença dessas células dispersas na derme, próximas aos vasos sanguíneos. Em (D) Formação de fendas entre a epiderme e a derme, preenchidas com células inflamatórias (setas). (E) Degeneração das papilas arborizantes com formação de pústulas (setas). (F) À direita, duas extensões papilares com áreas degeneradas e à esquerda, papilas sem degeneração, onde epiderme e derme podem ser distinguidas. Coloração H&E.

Figura 16 - Áreas com infiltração de células mononucleares em tumores de pele (A-D) e oculares (E-F) em cortes ultrafinos (2 μ m de espessura), corados com H&E. (B-D) Presença de heterófilos distribuídos na derme, apontados por setas. (D) Heterófilos esparsos na derme com grânulos eosinofílicos bem evidentes, apontados por setas. (E) Linfócito, monócito e melanomacrófago apontados por seta preta, branca e ponta de seta, respectivamente. (F) Linfócito apontado por seta.

4.4.1.3.3 Tumores oculares

Histologicamente, as massas tumorais oculares foram sugestivas de tumores de conjuntiva, com alto grau de arborização.

Foram observados três tipos de epitélio: epitélio estratificado escamoso cornificado, não cornificado e epitélio estratificado cornificado com células caliciformes em sua base. Em todas as biópsias oculares notou-se evidente hiperplasia da epiderme com número elevado de camadas de células e estroma subjacente engrossado e bem vascularizado, como mostrado na Figura 17 (A-F).

Uma característica marcante diferenciava as biópsias de pele das biópsias oculares. Apenas as últimas apresentavam projeções epidermais que se estendiam para o estroma, conhecidas como *rete pegs*, podendo ser numerosas, longas ou curtas (Figura 17C e F).

As biópsias oculares que apresentaram leve hiperqueratose ora continham núcleo no estrato córneo, mostrando tratar-se de paraqueratose (C e D), ora não estavam presentes, típico de ortoqueratose. Inclusões córneas foram visualizadas nas camadas epidérmicas hiperplásicas e na derme (apontada por seta), como mostra a Figura 17E. A presença de possíveis parasitas, circundados por células gigantes multinucleadas, foi observada no estroma tumoral ocular de um animal (Figura 17A). Células pigmentadas com projeções alongadas foram observadas na epiderme tumoral de alguns cortes, sendo sugestivas de cromatóforos (Figura 17G e H).

Figura 17 - (A-H) Cortes histológicos de tumores oculares dos animais T10.11 e T17.11. (A e B) Epitélio estratificado com evidente presença de células calciformes apontadas por setas brancas. Presença de estrutura ovalada e acastanhada de possível patógeno, apontado por seta preta branca. (A); (C-D) Epiderme hiperplásica com moderada hiperqueratose paraqueratótica, com núcleo apontado por seta. A seta preta aponta *rete peg*. E) Inclusão córnea (IC) na derme, apontado por seta; (F) Epiderme hiperplásica com derme espessa subjacente ricamente vascularizada. Presença marcante de *rete pegs* (setas); (G e H) Elevado número de camadas epiteliais com células apresentando núcleos discarióticos e núcleos circundados por halo claro. Na epiderme hiperplásica notam-se cromatóforos apontados por setas.

4.4.2 Detecção viral por métodos moleculares

4.4.2.1 Reação de amplificação gênica em cadeia pela polimerase (PCR/*rt*PCR)

A amplificação da sequência específica dos vírus ChHV5 somente foi possível com a utilização dos *primers* descritos por LU et al., 2000 (Tabela 2) e, portanto, foram

escolhidos e utilizados em todos os ensaios, tanto para as reações de PCR como para as reações de *nested*-PCR, gerando fragmentos de 445 pb e 206 pb, respectivamente (Figura 18 e Figura 19). Somente as amostras que não amplificaram na primeira reação de PCR foram submetidas à uma nova reação de amplificação. Todas as amostras foram então submetidas à reação de *nested*-PCR.

Figura 18 - Resultados obtidos pela reação de PCR a partir de suspensões tumorais de tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas* coletadas em 2011 na região de Ubatuba/SP. Eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Fragmento específico de 445 pb de CFPHV: amostras 34, 35, 91 a 109, 129 e 175; amostras indeterminadas: 89, 90, 128 e 130; amostras negativas: 131 a 149; L: Padrão de peso molecular, *Ladder* 100pb (Invitrogen®); C-: Controle negativo.

Figura 19 - Resultados obtidos pela reação de PCR (lado esquerdo) e *nested*-PCR (lado direito). Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de suspensões tumorais de tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas* coletadas em 2011 na região de Ubatuba/SP. Fragmento específico de 445 pb de CFPHV: amostras 55, 57, 103 e 134; fragmento de 206 pb obtidos após reação de *nested*-PCR: amostras 70, 162 e 84; amostras negativas: 16, 38 e 119; L: Padrão de peso molecular, *Ladder* 100pb (Invitrogen®); C-: Controle negativo.

De um total de 158 amostras processadas, 51 correspondem a amostras de saliva; 58 amostras de secreção ocular; 46 amostras tumorais de pele, de olho e de pulmão, além de três amostras de pele normal, conforme mostra a Tabela 9.

Do total, somente seis amostras provenientes de suspensões de tumores, e uma amostra de saliva, não amplificaram na primeira reação de PCR, mas positivaram no *nested*-PCR.

Tabela 9 - Número total de amostras processadas pela reação de PCR, *nested*-PCR e submetidas à reação de sequenciamento gênico do período 2001-2012.

Amostras	Processadas	PCR e <i>nested</i> -PCR			
		Positivas		Negativas	
		N	%	N	%
Pele Normal	3	1	33,3	2	66,7
Saliva	51	14	27,5	37	72,5
Secreção Ocular	58	23	39,7	35	60,3
Tumor de pele	40	29	72,5	11	27,5
Tumor de olho	3	3	100,0	0	0
Tumor de pulmão	3	3	100,0	0	0
Total (N)	158	73		85	

De um total de 46 (100%) tumores processados, 35 (76,1%) apresentaram a sequência específica do ChHV5, sendo 29 (72,5%) de tumores de pele, 3 (100%) tumores oculares e 3 (100%) tumores de pulmão. Esta mesma sequência foi detectada nas secreções oculares de 23 (39,7%) animais; em 14 (27,5%) amostras de saliva e na pele normal de um animal (33,3%) (Tabela 9).

Cinco animais (R03.05; R05.06; R06.06; R20.11; R21.11) tiveram sequências do ChHV5 amplificadas em tumores de pele e na secreção ocular; dois animais (R08.06; R10.11) em tumores de pele e tumor ocular, e um animal (R22.11) na secreção ocular e saliva, respectivamente.

4.4.2.2 Sequenciamento gênico

4.4.2.2.1 Quantificação de DNA para o sequenciamento

Os resultados da quantificação dos produtos amplificados, após a reação de PCR das amostras positivas, estão demonstrados na Figura 20. Os valores estimados, em ng/μl, das diferentes concentrações dos produtos amplificados obtidos, provenientes de suspensões tumorais, estão do lado direito (B).

De um total de 73 amostras positivas, 40 apresentaram quantidade suficiente de DNA para a caracterização pelo sequenciamento genômico.

Figura 20 - (A) Quantificação dos produtos amplificados (445 pb), após reação de PCR, a partir de suspensões tumorais positivas para o ChHV5. *ML*: Padrão de peso molecular, *Low DNA Mass Ladder*® (Invitrogen), lado esquerdo da figura. (B) Os valores estimados das concentrações de DNA, em ng/μl, de amostras positivas, após a comparação com o padrão de peso molecular.

4.4.2.2 Reação de sequenciamento

As sequências de nucleotídeos de 40 amostras obtidas pela reação de PCR, provenientes de 28 suspensões de tumores, 10 amostras de secreção ocular e 2 amostras de saliva, foram caracterizadas pelo sequenciamento gênico.

Vinte e nove sequências geradas foram depositadas no *Genbank* sob os números: KR048335; KR048336; KR048337; KR048338; KR048339; KR048340; KR048341; KR048342; KR048343; KR048344; KR048345; KR048346; KR048347; KR048348; KR048349; KR048350; KR048351; KR048352; KR048353; KR048354; KR048355; KR048356; KR048357; KR048358; KR048359; KT719378; KT719379, KT719380 e KT719381.

As amostras sequenciadas estão apresentadas na Tabela 10 com os respectivos registros dos animais e números do *Genbank*.

Tabela 10 - Amostras de tumores, secreção ocular e saliva, provenientes de animais coletados no período 2001-2011, com seus respectivos registros, submetidas à reação de sequenciamento gênico e caracterizadas pela análise filogenética.

Sequenciamento Gênico							
Dados dos animais				Registros das amostras			
Registro ICB	Macroscopia	Procedência	Data da coleta	Número da amostra	Tipo de amostra	GENOMA/USP	Registro da amostra no GENBANK
							Número GENBANK
R39.01	FP	Ubatuba SP	13.02.01	1	Tumor de pele	TAM 77/78 (tp)	BR SP ICB 78 KT719379
R44.01	FP	Ubatuba SP	13.02.01	4	Tumor de pele	TAM 49/50 (tp)	BR SP ICB 50 KR048354
R45.01	FP	Ubatuba SP	13.02.01	7	Tumor de pele	TAM 79/80 (tp)	BR SP ICB 80 KT719380
R46.01	FP	Ubatuba SP	13.02.01	10	Tumor de pele	TAM 81/82 (tp)	BR SP ICB 82 KT719381
R48.01	Normal	Ubatuba SP	13.02.01				
R02.02	FP	Ubatuba SP	19.03.02	15	S. ocular	TAM 86F/R (so)	
R03.02	FP	Ubatuba SP	19.03.02	17	S. ocular	TAM 84F/R (so)	-
R02.05	FP	Ubatuba SP	23.08.05	34	Tumor de pele	TAM 21/31 (tp)	BR SP ICB 21 KR048345
R03.05	FP	Ubatuba SP	23.08.05	27; 35	S. ocular; Tumor de pele	TAM 83F/R (so); TAM 22/32 (tp)	BR SP ICB 22 KR048346 (tp)
R04.05	FP	Ubatuba SP	23.08.05	29	S. ocular	TAM 84F/R (so)	-
R05.05	FP	Ubatuba SP	23.08.05	33	S. ocular	TAM 89/90 (so)	
R06.05	FP	Ubatuba SP	23.08.05	89a	Tumor de pele	TAM 85F/R (tp)	-
R05.06	FP	Ubatuba SP	29.03.06	87; 91	S. ocular; Tumor de pele	TAM 51/52(so); TAM 23/33 (tp)	BR SP ICB 52; 23 KR048355 (so); KR048347 (tp)
R06.06	FP	Ubatuba SP	29.03.06	88; 92	S. ocular; Tumor de pele	TAM 53/54 (so); TAM 24/34 (tp)	BR SP ICB 54; 24 KR048356 (so); KR048348 (tp)
R07.06	FP	Ubatuba SP	26.04.06	106	Tumor de pele	TAM 25/35 (tp)	BR SP ICB 25 KR048349
R08.06	FP	Ubatuba SP	26.04.06	107, 108; 109	Tumor de pele; Tumor ocular	TAM 26/36/27/37 (tp); TAM 28/38 (tp)	BR SP ICB 26; 28 KR048350 (tp); KR048351 (tp)
R09.06	FP	Ubatuba SP	24.05.06	129	Tumor de pele	TAM 29/39 (tp)	BR SP ICB 29 KR048352
R10.06	FP	Ubatuba SP	24.05.06	131	Tumor de pele	TAM 91/92 (tp)	
R19.06	FP	Ubatuba SP	04.09.06	170	Tumor de pele	TAM 95/96 (tp)	
R20.06	FP	Ubatuba SP	22.06.06	141	S. ocular	TAM 93/94 (so)	
	recaptura	04.09.06		175	Tumor de pele	TAM 30/40/41/42 (tp)	BR SP ICB 30 KR048353
R02.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	5	Tumor de pele	TAM 11/12 (tp)	BR SP ICB 12 KR048340
R03.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	16	Tumor de pele	TAM 13/14 (tp)	BR SP ICB 14 KR048341
R04.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	18	S. ocular	TAM 97/98 (so)	
R05.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	23	Tumor de pele	TAM 15/16 (tp)	BR SP ICB 16 KR048342
R06.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	25	Tumor de pele	TAM 17/18 (tp)	BR SP ICB 18 KR048343
R09.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	31	Saliva	TAM 87F/R (sa)	-
R10.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	58; 55, 57	Tumor ocular; Tumor de pele	TAM 1/2(tp); TAM 3/4/5/6 (tp)	BR SP ICB 2; 4; 6 KR048335 (tp); KR048336, KR048337 (tp)
R17.11	FP	Ubatuba SP	10.05.11	103	Tumor de pele	TAM 07/08 (tp)	BR SP ICB 8 KR048338
	recaptura	29.08.11		134; 136	Tumor de pele; S. ocular	TAM 9/10 (tp); TAM 59/60 (so)	BR SP ICB 10 KR048339 (tp)
R18.11	FP	Ubatuba SP	10.05.11	105	S. ocular	TAM 57/58 (so)	
R19.11	FP	Ubatuba SP	10.05.11	122	S. ocular	TAM 99/100 (so)	
R21.11	FP	Ubatuba SP	29.08.11	161b; 149	Tumor de pele; S. ocular	TAM 19/20 (tp); TAM 61/62 (so)	BR SP ICB 20; 62 KR048344 (tp); KR048357 (so)
R22.11	FP	Ubatuba SP	29.08.11	163; 164	Saliva; S. ocular	TAM 63/64 (sa); TAM 65/66 (so)	BR SP ICB 64; 66 KR048358 (sa); KR048359 (so)
R02.12	FP	Ubatuba SP	19.04.12	187	Saliva	TAM 88F/R (sa)	-
R08.12	FP	Santos SP	09.10.12	165	Tumor de pulmão (fibroma)	TAM 44/45/46 (fr)	BR SP ICB 44 KT719378

As sequências de nucleotídeos obtidas no presente estudo mostraram-se específicas do herpesvírus ChHV5, após comparação com as sequências já descritas e depositadas no *GenBank* usando o algoritmo *Blast*.

4.4.2.2.2.1 Sequências de nucleotídeos

A Figura 21 apresenta o alinhamento das sequências de nucleotídeos parciais do gene da polimerase viral do ChHV5 obtidas das amostras, assim como das sequências depositadas no *Genbank* e usadas para comparação (Tabela 4).

Figura 21 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos parciais da DNA polimerase de herpesvírus ChHV5 detectadas em *C. mydas* no presente estudo e de amostras provenientes do Genbank, utilizando o programa Ugene versão 1.17.0. As similaridades existentes estão representadas por pontos em relação à amostra de referência HQ000007 (em destaque), proveniente do Golfo da Guiné (GG), usada para comparação. As substituições de nucleotídeos estão destacadas em caixas coloridas. (Parte 1)

Figura 21 – Alinhamento das sequências de nucleotídeos parciais da DNA polimerase de herpesvírus CHHV5 detectadas em *C. mydas* no presente estudo e de amostras provenientes do Genbank, utilizando o programa Ugene versão 1.17.0. As similaridades existentes estão representadas por pontos em relação à amostra de referência HQ000007 (em destaque), proveniente do Golfo da Guiné (GG), usada para comparação. As substituições de nucleotídeos estão destacadas em caixas coloridas (Parte 2).

O alinhamento das sequências parciais da polimerase viral revelou pequenas diferenças entre as amostras analisadas. Dois perfis de sequências gênicas obtidas neste estudo, designados como 1 e 2 podem ser visualizados nas Figuras 21, 22 e 23. Cinco amostras, KR38340, KR38341, KR38350, KR38351 e BR SP ICB 27 apresentaram o perfil 1, e outras 34 amostras apresentaram o perfil 2.

A análise de identidade das amostras brasileiras e mundiais, gerada no programa *DNASar*, está demonstrada na Tabela 11. A Tabela 11 mostra as similaridades e divergências encontradas entre todas as sequências de nucleotídeos analisadas. As amostras analisadas apresentaram um percentual de identidade de nucleotídeos variando de 86,1 a 100% entre si (Tabela 11).

As amostras cujas sequências de nucleotídeos apresentaram o perfil 1 compartilharam 100% de identidade com a amostra brasileira JN938585 descrita em um estudo prévio (Rodenbusch, 2013) como mostra a Tabela 11 em destaque. Na árvore filogenética gerada, essas amostras compartilham o mesmo clado (Figura 24). Uma similaridade de 100% também foi observada com as amostras do perfil 2 em relação à duas amostras brasileiras desse mesmo estudo prévio (JN938586 e JN938587), além de sete amostras provenientes do Golfo da Guiné (HQ0000007, HM348898) e de Porto Rico (JN5801280, JN5801281, JN5801282 e JN5801284), Tabela 11.

Tabela 11 - Tabela de porcentagem de identidade (acima da diagonal) e distância (abaixo da diagonal) entre as sequências nucleotídicas do gene da polimerase (445 nt) obtidos nesse estudo e os descritos no Genbank. As amostras destacadas em vermelho e azul são amostras provenientes do Brasil, as primeiras referem-se às amostras do presente estudo (Perfil 1, 2) e as últimas são provenientes de estudo prévio (Rodenbusch *et. al.* 2014), respectivamente.

Percentual de similaridade																																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37			
Amstras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37			
1	AF49304	982	962	956	954	881	888	888	887	966	966	966	966	966	966	966	966	966	962	962	962	962	962	962	962	962	957	962	960	960	960	962	962	964	966	966	962	960	1	
2	AF298107	39	████	903	957	984	894	872	872	888	987	987	975	987	988	987	983	996	993	996	991	996	996	996	996	996	991	996	993	993	996	996	989	987	993	996	993	993	2	
3	AF299108	42	07	████	960	982	880	887	887	883	984	984	984	984	984	984	984	991	993	993	993	993	993	993	993	993	993	989	993	991	991	993	993	987	984	991	993	991	3	
4	AF299109	37	44	42	████	964	881	888	888	887	962	971	962	962	962	965	967	965	965	963	967	967	967	967	967	967	967	957	963	967	955	965	967	967	960	962	965	967	955	4
5	AF299110	05	16	37	████	885	876	876	91	988	998	980	988	988	987	998	988	982	984	984	984	984	984	984	984	984	984	982	984	982	984	984	984	984	984	986	998	982	984	5
6	AF390420	46	08	13	46	18	████	969	969	964	883	883	883	883	883	882	882	890	892	880	892	892	892	892	892	892	888	882	890	890	890	892	885	885	885	890	892	890	6	
7	AF390421	15	33	38	15	28	36	████	1000	975	874	874	888	874	874	872	874	870	867	870	867	870	870	870	870	870	870	865	870	867	867	870	870	872	874	867	870	867	7	
8	AF390422	15	33	38	15	28	36	00	████	975	874	888	874	874	874	874	870	867	870	867	870	870	870	870	870	870	870	865	870	867	867	870	870	872	874	867	870	867	8	
9	AF39516	38	15	20	38	00	18	28	████	969	899	870	899	899	888	899	885	885	883	885	883	885	885	885	885	885	885	883	885	883	885	883	885	885	887	889	883	885	9	
10	AY46888	35	14	16	39	02	20	31	31	02	████	1000	962	1000	989	1000	984	987	984	987	982	987	987	987	987	987	987	987	984	984	984	984	987	987	988	1000	984	987	10	
11	AY46889	25	44	16	39	02	20	31	31	02	00	████	962	1000	989	1000	984	987	984	987	982	987	987	987	987	987	987	987	984	984	984	984	987	987	988	1000	984	987	11	
12	AY46890	35	44	46	30	42	44	15	15	36	39	33	████	882	962	980	962	960	960	957	960	955	960	960	960	960	960	955	960	960	962	960	962	960	962	967	960	957	960	12
13	AY46891	35	14	16	39	02	20	31	31	02	00	39	████	1000	989	1000	984	987	984	987	982	987	987	987	987	987	987	984	984	984	984	987	987	988	1000	984	987	987	13	
14	AY46892	35	14	16	39	02	20	31	31	02	00	39	00	████	989	1000	984	987	984	987	982	987	987	987	987	987	987	984	984	984	984	987	987	988	1000	984	987	984	14	
15	AY46893	37	02	15	42	08	33	33	15	11	42	11	11	████	989	996	988	998	993	998	998	998	998	998	998	998	998	993	998	996	996	998	998	998	998	996	998	996	15	
16	AY46894	34	15	16	39	02	20	31	00	00	39	00	00	11	████	964	987	984	987	982	987	987	987	987	987	987	987	984	984	984	984	987	987	988	1000	984	987	16		
17	H348895	42	07	09	46	18	10	36	36	18	16	16	42	16	05	16	████	986	996	998	993	998	998	998	998	998	998	993	998	996	996	998	998	987	984	996	998	996	17	
18	H348896	39	05	07	44	16	10	36	36	18	14	14	42	14	02	14	02	14	02	998	1000	996	1000	1000	1000	1000	996	1000	998	998	1000	998	998	1000	989	987	998	1000	98	18
19	H348897	42	07	09	46	18	13	38	38	20	16	14	42	16	05	16	05	02	998	993	998	998	998	998	998	998	993	998	996	996	998	998	987	984	996	998	996	19		
20	H348898	39	05	07	44	16	10	36	36	18	14	14	42	14	02	14	02	02	996	1000	996	1000	996	1000	996	1000	998	998	998	998	1000	998	998	997	998	998	998	998	20	
21	HQ000006	44	09	11	49	21	13	38	38	20	18	18	47	18	07	18	07	05	07	05	████	996	996	996	996	996	991	996	993	993	996	996	984	982	993	996	993	21		
22	HQ000007	39	05	07	44	16	10	36	36	18	14	14	42	14	02	14	02	02	00	05	1000	1000	996	1000	998	998	1000	998	998	1000	998	997	998	1000	998	998	998	22		
23	JN302779	39	05	07	44	16	10	36	36	18	14	14	42	14	02	14	02	02	00	05	00	████	1000	1000	996	1000	998	998	1000	998	998	1000	989	987	998	1000	998	998	23	
24	JN302800	39	05	07	44	16	10	36	36	18	14	14	42	14	02	14	02	02	00	05	00	████	1000	996	1000	998	998	1000	998	998	1000	989	987	998	1000	998	998	24		
25	JN302801	39	05	07	44	16	10	36	36	18	14	14	42	14	02	14	02	02	00	05	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	989	987	998	1000	998	25
26	JN302822	39	05	07	44	16	10	36	36	18	14	14	42	14	02	14	02	02	00	05	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	989	987	998	1000	998	26
27	JN302823	44	09	11	49	18	15	41	41	20	16	16	47	16	07	16	07	05	07	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	996	996	996	996	27	
28	JN302824	39	05	07	44	16	10	36	36	18	14	14	42	14	02	14	02	02	00	05	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	989	987	998	1000	998	28
29	JN303584	42	07	09	46	18	13	38	38	20	16	16	44	16	05	16	05	02	05	02	07	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	996	998	996	29	
30	JN303585	42	07	09	46	18	13	38	38	20	16	16	44	16	05	16	05	02	05	02	07	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	996	998	996	30	
31	JN303586	39	05	07	44	16	10	36	36	18	14	14	42	14	02	14	02	02	00	05	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	998	998	996	31	
32	JN303587	39	05	07	44	16	10	36	36	18	14	14	42	14	02	14	02	02	00	05	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	998	998	996	32	
33	JN303588	37	11	14	42	05	18	33	33	05	02	02	02	02	09	02	14	11	16	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	998	987	33	
34	JN303589	35	14	16	39	02	20	31	31	02	00	39	00	00	11	00	16	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	02	984	984	34	
35	Peril 1	42	07	09	46	18	13	38	38	20	16	16	44	16	05	16	05	02	05	02	07	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	35
36	Peril 2	42	07	09	46	18	13	38	38	20	16	16	44	16	05	16	05	02	05	02	07	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	36

As sequências gênicas com perfil 1 foram provenientes de amostras de tumores de pele dos animais R08.06, R02.11 e R03.11 e de tumor ocular do animal R08.06. Todas essas sequências foram idênticas entre si, assim como as sequências com perfil 2.

4.4.2.2.2 Sequências de aminoácidos

A Figura 22 apresenta o alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos obtidos neste estudo em comparação com as amostras descritas mundialmente e disponibilizadas no *Genbank*. As divergências encontradas entre os resíduos de aminoácidos das sequências analisadas estão em destaque, envoltos por uma caixa colorida.

Figura 22 - Alinhamento das seqüências parciais deduzidas de aminoácidos geradas pelo programa *Ugene* (versão 1.17.0). As amostras obtidas foram comparadas entre si e com as amostras de referência do *Genbank*. As caixas coloridas apresentam todas as substituições dos resíduos de aminoácidos encontradas em relação à amostra de referência HQ0000007, proveniente do Golfo da Guiné, em destaque.

Quando comparadas entre si, cinco amostras apresentaram mudança de aminoácido na posição 127, representada pela substituição do nucleotídeo G pelo A, ocasionando uma substituição do aa ácido aspártico (D) pelo aa asparagina (N), mostrando tratar-se de uma mutação não sinônima. A Figura 23 apresenta essas mudanças em detalhe.

Figura 23 - Detalhe do alinhamento das sequências parciais deduzidas de aminoácidos de ChHV5, posições 114 a 149, obtidas no presente estudo e de amostras provenientes do *Genbank*, utilizando o programa *Ugene* versão 1.17.0. As amostras foram comparadas entre si. Em destaque a amostra de referência HQ000007, proveniente do Golfo da Guiné (GG), usada para comparação. As substituições dos resíduos de aminoácidos estão destacadas em caixas coloridas. As amostras brasileiras estão envoltas na caixa. As amostras deste estudo KR048340, KR048341, KR048350 e KR048351 apresentaram o Perfil 1 (P1) e as remanescentes o Perfil 2.

4.4.3 Análise filogenética

A árvore filogenética gerada para a inferência filogenética está

A árvore filogenética gerada revelou quatro clados (Figura 24). As amostras brasileiras do presente estudo agruparam-se com o clado do grupo filogeográfico do Atlântico, descrito em estudo prévio, com o valor de 89% de *bootstrap*. Dentro desse mesmo grupo as cinco amostras do perfil 1 estão mais intimamente relacionadas com a amostra brasileira JN938585, cujo valor de *bootstrap* foi de 64%.

As amostras remanescentes agruparam-se em clados distintos, descritos como grupos do leste do Pacífico, Atlântico ocidental/leste do Caribe, centro-oeste do Pacífico, conforme sinalizado na Figura 24.

Figura 24 - Árvore filogenética gerada a partir das sequências de nucleotídeos obtidos que codificam o gene da polimerase dos ChHV5, comparada com as sequências obtidas em diferentes regiões do mundo. Dendrograma construído utilizando o programa MEGA. KR048335-59, KT719378-81 e BR SP ICB amostras brasileiras deste estudo. O grupo filogeográfico do Atlântico está destacado em azul. Os valores de *bootstrap* estão destacados em vermelho. Comprimento do ramo indica distância entre as sequências.

4.5 Resultados gerais

Os resultados gerais obtidos de todas as análises do presente estudo foram compilados e estão mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados globais obtidos no presente estudo após as análises histológicas e moleculares de amostras obtidas de tartarugas marinhas provenientes do sudeste do Brasil no período de dez anos.

Dados dos animais					RESULTADOS GLOBAIS								
					HP	Métodos Moleculares					Sequenciamento Gênico	Perfil	
						Reação de PCR e nested PCR							
ANO	Registro ICB	Macroscopia	Procedência	Data de coleta	C. de inclusão	Pele normal	Saliva	Secreção ocular	Tumor de pele	Tumor de olho	Tumor or de pulmão	Sequência obtidas	Perfil
2001	R39.01	FP	Ubatuba SP	13.02.01					+			TAM 77/78 (tp)	1
	R44.01	FP	Ubatuba SP	13.02.01			+	-	+			KR048354	1
	R45.01	FP	Ubatuba SP	13.02.01					+			TAM 79/80 (tp)	1
	R46.01	FP	Ubatuba SP	13.02.01			-	-	+			TAM 81/82 (tp)	1
	R48.01	Normal	Ubatuba SP	13.02.01		+							
2002	R01.02	FP	Ubatuba SP	19.03.02				-				-	
	R02.02	FP	Ubatuba SP	19.03.02				-				-	
	R03.02	FP	Ubatuba SP	19.03.02			-	+				TAM 86F/R (so)	1
2005	R01.05	Normal	Ubatuba SP	23.08.05			-	-				-	
	R02.05	FP	Ubatuba SP	23.08.05			+	+	+			KR048345	1
	R03.05	FP	Ubatuba SP	23.08.05				+	+	+		KR048346 (tp)	1
	R04.05	FP	Ubatuba SP	23.08.05			+	+				TAM 84F/R (so)	1
	R05.05	FP	Ubatuba SP	23.08.05			+	+	+				
	R06.05	FP	Ubatuba SP	23.08.05			-	-	+			TAM 85F/R (tp)	1
2006	R01.06	FP	Ubatuba SP	13.02.06			-		+			-	
	R02.06	FP	Ubatuba SP	13.02.06				+	+			-	
	R03.06	FP	Ubatuba SP	13.02.06				-	-			-	
	R04.06	FP	Ubatuba SP	13.02.06				-	-			-	
	R05.06	FP	Ubatuba SP	29.03.06			-	+	+	+		KR048355 (so); KR048347 (tp)	1
	R06.06	FP	Ubatuba SP	29.03.06			-	+	+			KR048356 (so); KR048348 (tp)	1
	R07.06	FP	Ubatuba SP	26.04.06			+	-	+			KR048349	1
	R08.06	FP	Ubatuba SP	26.04.06			-	-	+	+		KR048350 (tp); KR048351 (tp)	2
	R09.06	FP	Ubatuba SP	24.05.06			-	-	+			KR048352	1
	R10.06	FP	Ubatuba SP	24.05.06			-	-	+			-	Ind.
	R11.06	FP	Ubatuba SP	13.02.06				-	-			-	
	R20.06	FP	Ubatuba SP	22.06.06			-	+	+			-	
	R16.06	FP	Ubatuba SP	22.06.06			-	-	-			-	
	R17.06	FP	Ubatuba SP	22.06.06			+	+	-			-	
	R18.06	FP	Ubatuba SP	04.09.06			-	-				-	
	R19.06	FP	Ubatuba SP	04.09.06			-	-	+			-	Ind.
	R20.06	FP	Ubatuba SP	04.09.06			-	-	+			KR048353	1
	R22.06	FP	Ubatuba SP	11.06			+	-				-	
	R23.06	FP	Ubatuba SP	11.06				-				-	
2011	R01.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	-		-	-				-	
	R02.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	-		-	+	+			KR048340	2
	R03.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	+		-	+	+			KR048341	2
	R04.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	-		+	+				-	
	R05.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	-		-	-	+			KR048342	1
	R06.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	-		+	+	+			KR048343	1
	R07.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	-			-				-	
	R08.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	-		-	-				-	
	R09.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	-		+	+	-			TAM 87F/R (sa)	1
	R10.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	+		-	-	+	+		KR048335 (tp); KR048336, KR048337 (tp)	1
	R11.11	FP	Ubatuba SP	24.02.11	+		-	-	-			-	
	R12.11	Normal	Ubatuba SP	24.02.11	-		-	-				-	
	R13.11	Normal	Ubatuba SP	24.02.11	-		-	-				-	
	R14.11	Normal	Ubatuba SP	24.02.11	-		-	-				-	
	R15.11	Normal	Ubatuba SP	24.02.11	-		-	-				-	
	R16.11	Normal	Ubatuba SP	24.02.11	-		-	-				-	
	R17.11	FP	Ubatuba SP	10.05.11	+		-	-	+			KR048338	1
	R18.11	FP	Ubatuba SP	10.05.11	+		-	+	-			TAM 57/58 (so)	Ind.
	R19.11	FP	Ubatuba SP	10.05.11	+		-	+	+			-	Ind.
	R20.11	Normal	Ubatuba SP	10.05.11	-		-	-				-	
	R20a.11	FP	Ubatuba SP	29.08.11	+		+	+	+			KR048339 (tp)	1
	R21.11	FP	Ubatuba SP	29.08.11	+		-	+	+			KR048344 (tp); KR048357 (so)	1
	R22.11	FP	Ubatuba SP	29.08.11	+		+	+	+			KR048358 (sa); KR048359 (so)	1
	R23.11	Normal	Ubatuba SP	29.08.11								-	
	R24.11	Normal	Santos SP	10.12		-						-	
	R25.11	Normal	Santos SP	10.12		-						-	
	R26.11	Normal	Santos SP	10.12	-							-	
	R27.11	Normal	Santos SP	10.12	-							-	
	R28.11	Normal	Santos SP	10.12	-							-	
R29.11	FP	Santos SP	10.12							+	-	1	
2012	R29.12	FP	Ubatuba SP	19.04.12	-		-	-					
	R34.12	FP	Ubatuba SP	19.04.12	-		-	+					
	R31.12	FP	Ubatuba SP	19.04.12	-		-	-	-				
	R30.12	FP	Ubatuba SP	19.04.12	+		+	+	-				1
	R33.12	FP	Ubatuba SP	19.04.12	-		-	-	-				
	R32.12	FP	Ubatuba SP	19.04.12	+		-	-	-				

(sa) saliva; (so) secreção ocular; (tp) tumor de pele; (to) tumor de olho; (fr). Áreas hachuradas: amostras não obtidas.

4.6 Publicação científica

Os resultados parciais das análises realizadas no presente estudo foram publicados no periódico *Veterinary Microbiology*:186 (2016) 150-156. O anexo X apresenta o resumo do trabalho disponibilizado no Pubmed. O trabalho completo pode ser acessado no endereço eletrônico: DOI: [10.1016/j.vetmic.2016.02.020](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.02.020).

5 DISCUSSÃO

A fibropapilomatose ocorre em tartarugas marinhas que normalmente habitam áreas tropicais e sub-tropicais neríticas e é mais frequentemente observada em tartarugas juvenis, sendo também relatada em sub-adultos e menos comumente em adultos (Adnyana et al., 1997; Herbst, 1994; Patrício et al., 2012; Work et al., 2004).

Nos estudos da FP a coleta de dados biométricos tem sido muito utilizada e útil para estimar a idade de animais normais e acometidos, além de correlacionar os dados obtidos com a condição clínica do animal. No presente estudo, a biometria dos animais com e sem FP revelou que os animais eram juvenis.

O aspecto macroscópico dos tumores dos animais deste estudo, que são considerados patognômicos para a FP (Herbst, 1994), mostrou-se típico e característico da doença.

O total do número de tumores encontrados, nos animais analisados no período de 2005-2012, variou de 2 a 129 tumores por animal (Tabela 5). Dos 36 animais analisados, oito (22,2%) tinham até dez tumores; cinco (13,9%) tinham até 20 tumores, oito (22,2%) tinham entre 31 e 40 tumores e os remanescentes (41,7%) tinham acima de 41 tumores por animal.

Baptistotte (2007) encontrou entre 1 a 179, sendo que 51,49% dos animais apresentaram até 12 tumores, com a média individual de 21 tumores. Entretanto, Adnyana et al., 1997, na Indonésia, obteve a média de 5 tumores por animal e 12,6% tinham mais que 10 tumores.

A maior frequência (58,2%) obtida dos tumores analisados neste estudo refere-se aos tumores classificados como escore 2, apenas 6 (0,5%) foram maiores que dez centímetros (Figura 9). Outros estudos brasileiros também obtiveram resultados semelhantes. (Baptistotte, 2007; Rossi, 2014). Ambos encontraram a maioria dos tumores analisados com escores que variavam entre 1 e 2 e apenas a minoria com escore 4 (maiores que 10 cm). Rodenbush et al. (2012) relatou que 67% dos animais analisados apresentaram tumores de escores entre 2 ou 3.

Rossi (2014) ao comparar os dados de CCC e o índice de condição corporal (ICC) dos animais analisados verificou que não houve relação direta entre o tamanho do animal, condição corporal e grau de severidade da doença.

No presente estudo, a frequência de tumores por região anatômica dos animais amostrados no período 2011-2012 revelou que a maior concentração de tumores foi observada na região anterior do corpo dos animais (68%), sendo que 53% estavam presentes somente nas nadadeiras anteriores (Figura 9).

No Brasil, dados obtidos por Baptistotte et al. (2007), a partir de uma ampla amostragem (4.335 animais) procedente do Espírito Santo, coletada no período 2000-

2005, revelaram que 72,5% dos tumores foram encontrados na região anterior, sendo que 50,1% estavam presentes somente nas nadadeiras anteriores e apenas 25,2% na região posterior do corpo dos animais. Em outro estudo brasileiro, Rossi (2014) encontrou 64,8% dos tumores na região anterior do corpo dos animais, com 75,8% somente nas nadadeiras. Dos tumores encontrados na região posterior do corpo dos animais, 96,1% concentravam-se também nas nadadeiras. Nossos dados corroboram os dados obtidos anteriormente no Brasil e sugerem que a região anterior do corpo dos animais pode ser mais predisposta a desenvolver tumores.

Para confirmar o diagnóstico de fibropapilomatose no presente estudo analisamos 160 fragmentos de biópsias de tumores, além de pele aparentemente saudável de tartarugas verdes. Somente uma biópsia de pele foi considerada normal e as remanescentes apresentavam algum tipo de alteração histopatológica.

Descrições histológicas de tumores cutâneos foram relatadas em diversos estudos iniciais sobre a fibropapilomatose em tartarugas marinhas e as análises revelaram características semelhantes entre os tumores analisados de diferentes procedências (Aguirre et al., 1994; Herbst et al., 1994; Jacobson et al., 1989; Lackovich et al., 1999). Porém, as frequências das alterações histológicas observadas nos tecidos tumorais somente foram descritas em estudos posteriores que apontaram, além dos traços histopatológicos como proliferação das camadas dérmicas e/ou epidérmicas, degeneração das camadas e/ou ulceração e outros aspectos relacionados à inflamação dos tecidos e presença de prováveis potenciais patógenos como vírus, parasitas, fungos e bactérias (Herbst et al., 1999; Kang et al., 2008; Lackovich et al., 1999; Matushima et al., 2001; Rodenbush et al., 2012; Work et al., 2014).

As principais alterações histopatológicas dos tumores de pele e oculares de *Chelonia mydas* que circularam nas águas brasileiras, observadas neste estudo, no período 2011-2012, confirmam o padrão descrito mundialmente.

Dentre as principais características histológicas da doença estão as lesões proliferativas descritas como papilomas, fibropapilomas e fibromas, com ou sem o comprometimento da epiderme e/ou derme (Herbst et al., 1994; Jacobson et al., 1989).

No presente estudo, as lesões observadas nos tecidos tumorais foram caracterizadas como papilomas e fibropapilomas. Fibromas não foram visualizados. Como eles representam o estágio mais crônico da doença e a nossa amostragem compreendia tumores de poucos milímetros a 1,5 cm, por ter maior probabilidade de se detectar o ChHV5, provavelmente as amostras foram coletadas nos primeiros estágios da doença.

Do total de amostras analisadas, as mais altas porcentagens das alterações histológicas encontradas nos tecidos tumorais do presente estudo foram hiperplasia da epiderme, observada em 95,5% dos casos, seguida por hiperqueratose (90,9%), infiltração de células mononucleares (86,4%) e proliferação da derme e discariose, ambas com 77,3% (Tabela 8). Nossos resultados são similares aos observados por Herbst et al. (1999) que encontraram, em um estudo completo e abrangente, 100% de hiperplasia da epiderme e 97,2% de hiperqueratose em tecidos que foram induzidos à fibropapilomatose, e índices ligeiramente mais baixos em tumores espontâneos.

Quanto à proliferação da derme, nossos resultados também são comparáveis aos obtidos por Herbst et. (1999). Essa característica foi encontrada em 77,3% das amostras brasileiras e, nos estudos conduzidos por Herbst et al., em 100% de tumores espontâneos e induzidos.

Entretanto, dois outros estudos brasileiros obtiveram resultados distintos. No Brasil, a primeira descrição histopatológica de tumores de pele em amostras de tartarugas verdes relata proliferação de epiderme e do estroma, além de hiperqueratose e núcleos discarióticos nas células da camada epitelial (Matushima et al., 2001). Nesse estudo pioneiro Matushima et al., (2001) apontaram 28% de hiperplasia da epiderme e 55% de proliferação da derme, índices inferiores aos encontrados no presente estudo. Contudo, Rodenbusch et al., (2012) relataram 70% e 98% das respectivas alterações histológicas, a partir de tumores analisados de animais provenientes de diferentes regiões do Brasil, inclusive de Ubatuba, São Paulo, coletados no período 2010-2012.

A formação de fendas na junção dermo-epidérmica, caracterizada pela separação da epiderme da derme superficial, é outro traço histológico observado em vários fibropapilomas examinados em alguns estudos (Brooks et al, 1994; Jacobson et al., 1989). Em 54,5% dos tumores aqui analisados observamos evidentes fendas, com ou sem depósito de material no seu interior. Resultados muito semelhantes foram obtidos em outros estudos, em tumores de pele induzidos e espontâneos e em tumores oculares (Brooks et al, 1994; Herbst et.,1999).

Neste estudo, em 63,6% das amostras analisadas, observamos alterações degenerativas que compreendiam extensas áreas com infiltrados de células mononucleares levando à formação de pústulas e úlceras com áreas de erosão resultantes de infiltração pesada de granulócitos, com respectivos detritos celulares e prováveis materiais proteicos (Figura 15). Uma única amostra de pele de animal sem FP (4,5%) também apresentou áreas com degeneração celular. Resultados comparáveis aos de Herbst et al., (1999), onde a presença de erosões cutâneas e

úlceras secundárias ou degeneração do estrato espinhoso foram também observadas em 35,8% e 38,7% de amostras havaianas e da Flórida, respectivamente. Os tumores induzidos experimentalmente tinham uma frequência significativamente maior de alterações degenerativas da camada espinhosa (Herbst et al., 1999).

O traço histológico mais característico da presença de ChHV5 em tecidos tumorais das tartarugas marinhas é a presença dos corpúsculos de inclusão intranucleares (Figura 13I e J e Figura 14). Entretanto, no primeiro estudo brasileiro (Matushima et al., 2001), eles não foram encontrados nos tecidos analisados. Neste estudo evidente epiderme proliferativa com degeneração de células balonizantes, contendo corpúsculos de inclusões intranucleares (CIIIs) típicos e sugestivos da presença de vírus esteve presente em 45,5% dos casos. As inclusões intranucleares estavam frequentemente presentes nas camadas mais externas da epiderme proliferativa, podendo facilitar o derramamento viral para o meio ambiente em casos de degeneração celular e/ou atrito da pele com superfícies em áreas de forrageamento. A presença dos CIIIs nos tecidos tumorais analisados neste estudo indicam que esta pode ser uma via de eliminação de vírus.

Os exames microscópicos dos cortes histológicos correspondentes às áreas de degeneração balonizante revelaram que se tratava de focos, cujas células continham evidentes corpúsculos de inclusão intranucleares (Figura 14). Resultados semelhantes foram obtidos por Work et. al., (2014), onde 35% de tartarugas verdes examinadas apresentaram tumores com a presença de CIIIs na camada epidérmica, apenas em áreas com focos e preferencialmente nos menores tumores. De acordo com esse estudo, a frequência de distribuição dos corpúsculos de inclusão em tumores é baixa e o derramamento e/ou espalhamento de vírus pelo epitélio parece ser esporádica.

Do total de dez animais que apresentaram corpúsculos de inclusão sugestivo de infecção viral nos tecidos examinados, seis deles também tiveram suas sequencias caracterizadas pelo sequenciamento gênico, discutido mais adiante, o animal **R03.11 (Tipo 1)** e os remanescentes (**R10.11; R11.11, R17.11, R18.11, R19.11, R21.11, R22.11 e R02.12**) como **Tipo 2**. Do ponto de vista histopatológico, todas as amostras apresentaram características semelhantes tanto em entre si, como também em relação às características histopatológicas descritas na literatura mundial, não havendo, portanto, nenhum traço histológico relevante que pudesse ser correlacionado com a diferença gênica observada nas amostras do presente estudo.

Até o presente, poucos estudos na literatura mundial referem-se à caracterização histopatológica de tumores oculares de animais com FP, apesar de ser amplamente aceito que ocorrem frequentemente e podem prejudicar ou provocar a

perda permanente da visão de animais acometidos (Jacobson et al, 1989; Herbst, 1994).

Todos os seis fragmentos de biópsias oculares desse estudo foram caracterizados como fibropapilomas, como relatado em amostras de tumores de córnea, limbo, conjuntiva e de junções mucocutâneas das pálpebras provenientes de tartarugas verdes da Flórida, Austrália e Porto Rico (Brooks et al., 1994; Flint et al., 2010; Kang et al., 2008). Esses estudos prévios relataram que histologicamente as massas tumorais oculares eram similares aos tumores de pele, constituídas de epitélio hiperplásico com estroma fibroso subjacente bem vascularizado, podendo apresentar epitélio estratificado escamoso queratinizado ou não, além da presença de numerosas células calciformes.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os descritos anteriormente. Entretanto, Brooks et al., (1994) relatou, em apenas um caso de lesão invasiva de córnea e esclera, a presença de necrose epitelial com ocasional degeneração de células em *balloning* em algumas seções. Nenhum dos fragmentos examinados neste estudo apresentou essas alterações, seja pelo pequeno número de amostras examinadas ou porque elas aparecem apenas excepcionalmente. Pelo nosso conhecimento, esse é o primeiro relato de descrição e caracterização de fibropapilomas oculares em tartarugas verdes de águas brasileiras.

O gene da polimerase viral dos herpesvírus, região conhecida como UL30, tem sido utilizado nas técnicas moleculares para detecção desses vírus por representar uma região altamente conservada dos herpesvírus humanos e de animais. Em estudos brasileiros prévios, sequências desse gene foram detectadas por reação de PCR tanto em amostras tumorais como em amostras de sangue, saliva e de secreções oculares de animais com FP (Menhert et al 2002; Monezi et al, 2006).

Para os ChHV5, além dessa região, regiões dos genes UL18, UL34 e da glicoproteína B tem sido utilizadas na caracterização e nos estudos de evolução desse vírus (Ackermann et al., 2012; Patrício et al., 2012; Quackenbush et al., 1998, 2001). Dos três genes alvos usados nas reações de PCR seguidas de *nested-PCR*, a DNA polimerase viral (UL30) provou ser superior para detecção do ChHV5 em relação a outros dois genes, o gene de maturação do cápside (UL26) e a glicoproteína B (UL27) (Page-Karjian et al., 2012). Sendo assim, a região UL30 foi o gene de eleição neste estudo.

O uso da técnica de PCR, seguida de *nested-PCR*, utilizando o gene alvo da polimerase viral se mostrou bastante satisfatório, pois, além da detecção do ChHV5 em tecidos tumorais, de pele, olho e pulmão, foi possível detectar a presença de

sequências gênicas virais em amostras de secreção ocular e saliva, além de pele de animais livres de tumores (Tabela 9).

No presente trabalho obtivemos resultados comparáveis a outros estudos que descreveram o uso da técnica de PCR seguida de *nested-PCR* para detecção do DNA do ChHV5 em tecidos tumorais e pele aparentemente saudáveis usando como gene alvo a DNA polimerase viral. O DNA viral foi detectado em 100% e 95,7% dos tumores analisados a partir de *C. mydas* provenientes das regiões do Havaí e da Flórida, respectivamente (Lackovich et al. 1999; Lu et al., 2000). No Brasil, 73% de amostras positivas de tumores, provenientes de tartarugas verdes com FP da costa brasileira, foram detectadas no período 2009-2010 (Rodenbusch et al., 2014).

Embora Lu et al., (2000) não tenham detectado sequências do vírus em nenhum dos tecidos de tartarugas livres de tumor, usando os mesmos *primers* e condições do presente estudo, nossos resultados demonstraram a presença do vírus na pele dos animais sem FP e corrobora os dados obtidos em outros estudos mais recentes (Alfaro-Núñez, Gilbert, 2014; Page-Karjian et al., 2012; Quackenbush et al., 2001).

Quackenbush et al., (2001) demonstrou pela primeira vez a presença do vírus em pele aparentemente saudáveis de animais com FP e, posteriormente, sequências de ChHV5 foram amplificadas com sucesso a partir de pele de animais livres de tumores (Alfaro-Núñez, Gilbert, 2014; Page-Karjian et al., 2012). O DNA de ChHV5 também foi detectado em pele normal de animais de Porto Rico, da Austrália, do Havaí e do Brasil (Lu et al., 2000; Page-Karjian et al., 2012; Quackenbush et al., 1998; Rodenbusch et al., 2014). Recentemente, Nunes et al., (2015) demonstraram que 15% de animais clinicamente saudáveis, globalmente distribuídos, apresentavam sequências de DNA de ChHV5 em tecidos normais.

Nossos resultados, baseados em análises moleculares de pele aparentemente saudável de animais com e sem FP, também coincidem com os resultados da literatura, uma vez que a sequência de nucleotídeos específica de ChHV5 foi detectada nos tecidos analisados, indicando que o vírus pode estar presente mesmo em animais aparentemente saudáveis, como ocorre com herpesvírus de outras espécies. Além disso, também detectamos a presença de corpúsculos de inclusão nos tecidos de pele aparentemente saudáveis de animais com FP, sugerindo a presença do vírus nesses tecidos, e corroborando os resultados encontrados em outras regiões.

Além da detecção de sequências gênicas do ChHV5 em amostras tumorais de animais com e sem fibropapilomatose, um dos objetivos deste estudo foi detectar a presença do vírus em secreções oculares e saliva, já que herpesvírus humanos e de

animais são comumente detectados nessas secreções nas fases de infecção ativa (Blackbourn et al., 1998; Sandmeyer et al., 2010).

Apesar da detecção consistente do vírus em amostras tumorais de tartarugas verdes utilizando métodos moleculares (Ene et al., 2005; Greenblatt et al., 2005; Herbst et al., 2008; Lackovich et al., 1999; Nigro et al., 2004; Quackenbush et al., 1998; Work et al., 2009; Yu et al., 2001), até recentemente, amostras de secreções de tartarugas marinhas com e sem FP não tinham sido testadas quanto a possível presença de ChHV5, excetuando-se um estudo prévio brasileiro (Monezi et al., 2006).

No presente estudo o DNA viral do ChHV5 foi detectado em 39,7% de amostras de secreção ocular e em 27,5% das amostras de saliva (Tabela 9). Este é o primeiro relato de detecção de ChHV5 de saliva em animais provenientes de águas brasileiras.

Apesar de prévio estudo (Work et al., 2014) ter hipotetizado que a transmissão de ChHV5 pode depender de superespalhadores, considerando apenas presença de vírus em tecidos tumorais, o presente estudo detectou a presença de ChHV5 em secreções oculares e amostras de saliva, além dos tecidos tumorais. Sendo assim, nossos resultados apoiam fortemente a hipótese de que esta pode ser uma provável via alternativa para a eliminação de vírus e portanto pode contribuir potencialmente para a disseminação do vírus.

Em meados de 2015, outro estudo relata a presença desses vírus em sangue, urina, *swab* cloacal e plasma, além de tecidos tumorais e pele não tumoral de animais com e sem sinais clínicos de FP (Page-Karjian et al., 2015). Segundo esse estudo recente, a presença de DNA viral no sangue pode sugerir um mecanismo crítico de transporte viral para a pele dos sítios de infecção inicial ou latência, ou vice e versa. Além disso, a presença de DNA viral na urina de animais sintomáticos e assintomáticos possibilita o derramamento de DNA de ChHV5 em seu ambiente através dessa via, e levanta a hipótese, pela primeira vez, que tartarugas são capazes de derramamento de DNA viral por uma rota diferente daquela através de células da pele infectadas. A presença do ChHV5 nessas secreções sugere a eliminação do vírus no ambiente marinho.

Além disso, Page-Karjian et al., observaram que o número médio de cópias de DNA viral na urina de tartarugas com sinais clínicos de FP (grupo A) foi uma ordem de magnitude maior do que a observada nos grupos de animais com histórico de FP, mas sem FP (grupo B) ou sem histórico de FP (grupo C) sugerindo que as primeiras são susceptíveis de lançar quantidades relativamente maiores de DNA viral em sua urina do que as tartarugas livres de tumor. Embora com dados limitados, a concordância

dos resultados, por eles obtidos, entre as amostras de sangue total e amostras de urina sugeriu que as tartarugas que apresentam moderada a elevada carga viral que circulam no sangue (DNAemia) poderiam ser mais propensas a lançar DNA viral em sua urina.

Entretanto, ChHV5 não foi detectado em nenhuma das amostras de saliva e de fezes dos três grupos de animais examinados (Page-Karjian et al., 2015), o que difere dos resultados aqui apresentados.

Os ensaios de *nested-PCR* tem sido usados largamente utilizados em adição ao PCR convencional, já que os resultados sugerem que podem aumentar a sensibilidade de detecção em até 10.000 vezes. Entretanto, no presente trabalho não encontramos uma diferença significativamente grande no número de amostras positivas pelo *nested-PCR* em relação ao PCR, diferindo, portanto, dos resultados encontradas por Lu et al., 2000 e Page-Karjian et al., (2012).

Uma alta concordância foi observada entre os resultados obtidos pelo PCR e pela reação de *nested-PCR*, exceto por algumas amostras. Das amostras analisadas de tumores, apenas seis foram negativas pela reação de PCR, mas positivaram nas reações de reamplificação e *nested-PCR*. O mesmo ocorreu com uma única amostra de secreção ocular. Esses resultados sugerem que a quantidade de DNA viral na amostra original era ínfima e, que provavelmente foi aumentada substancialmente após a reação de reamplificação, permitindo assim sua detecção por *nested-PCR*.

Quanto às amostras de saliva, quatro delas apresentaram resultados discordantes entre si nas reações de PCR e *nested-PCR*. De três amostras com resultados indeterminados ou supostamente positivos no PCR, porém com ressalvas, uma vez que além do fragmento na altura esperada para ChHV5, apresentavam outras bandas, de intensidades menores mas visíveis nos geles de agarose, apenas uma mostrou tratar-se do ChHV5, as remanescentes não confirmaram na reação de *nested-PCR*. Entretanto, os produtos amplificados da quarta amostra revelaram tratar-se de contaminação, após análises das sequências de nucleotídeos obtidas, uma vez que a sequência específica de uma bactéria ambiental foi identificada.

No presente estudo, os resultados encontrados nas reações de PCR seguidas de *nested-PCR*, das amostras coletadas de quatro animais capturados e recapturados em datas diferentes, mostraram resultados convergentes para as amostras de tumores, porém divergentes para as amostras de secreção ocular e saliva.

No caso dos tumores, o DNA viral do ChHV5 foi detectado em todas as amostras dos quatro animais capturados e recapturados em datas diferentes, mesmo

apresentando intervalos entre si, sugerindo que o vírus estava sendo eliminado pelas amostras tumorais durante todo o período analisado.

Quanto às amostras de secreções oculares dos olhos (direito e esquerdo) do animal R05.05, coletadas na mesma data, elas revelaram que em apenas um olho o animal excretava o vírus. Nas datas posteriores, ora apresentava o vírus, ora não apresentava. Dos três animais que tiveram amostras de saliva coletadas em datas diferentes, dois deles apresentaram divergência, positivo em uma data e negativo em outra. O outro animal (R20.06) não apresentou o vírus na saliva nem no momento da primeira coleta e nem tampouco três meses depois.

A diferença obtida nos resultados de PCR seguidos de nested-PCR, provenientes de amostras coletadas de animais capturados e recapturados em datas diferentes, tanto nas secreções oculares como nas amostras de saliva pode ser um indicativo de que o animal não estava eliminando o vírus no momento da coleta, mesmo sendo portador do vírus, uma vez que apresentavam o vírus nos tumores. Outra hipótese poderia ser porque a quantidade de DNA viral eliminada possivelmente fugiu do limite de detecção do método, impedindo assim sua detecção.

Uma das alternativas para elucidar essa questão pode ser o uso da metodologia de *Real-Time* PCR que propiciaria a quantificação exata das partículas virais que possivelmente são eliminadas em diferentes tipos de amostras, além disso o acompanhamento da eliminação de vírus poderia ser realizado em diferentes intervalos de tempo. Dois estudos relatam a superioridade desta metodologia em detectar.

Tendo em vista que no presente trabalho detectamos uma alta porcentagem de ChHV5 nas secreções oculares, sugerimos que um método de diagnóstico plausível seria a colheita de secreção ocular para detecção do vírus por método molecular. Além de ser um método alternativo, e bem menos invasivo, poderia ser um método de triagem, principalmente para animais assintomáticos (livres de tumor), uma vez que já foi hipotetizado que a prevalência de tartarugas com FP pode ser pequeno em relação ao número de tartarugas infectadas com ChHV5 (Nunes et al., (2015), facilitando assim a coleta de amostras em locais e/ou instalações onde não houvesse condições apropriadas para o manuseio dos animais.

Além da alta homologia das sequências de nucleotídeos obtidas neste estudo em relação às amostras mundiais descritas, a análise filogenética gerada neste estudo revelou a presença de dois perfis de sequências gênicas do ChHV5 (tipo-1 e tipo-2) em amostras de tartarugas verdes que foram coletadas em um período de dez anos

nas águas do litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil. Esses dados refletem forte homogeneidade entre os vírus que circulam ao redor de Ubatuba.

Cinco animais apresentaram a sequência tipo-1 e os outros 21 animais apresentaram a sequência tipo-2. Essas sequências diferiram entre si na posição de substituição de apenas um nucleotídeo na região amplificada da DNA polimerase viral (Figura 21). Esse único sítio variável, caracterizado pela substituição de nucleotídeos G para nucleotídeos A, quando traduzidos (Figura 23), revelou tratar-se de uma substituição não sinônima uma vez que foi caracterizado pela substituição do aminoácido ácido aspártico para asparagina (Asp→Asn).

A relevância e/ou ramificações desse achado ainda deve ser entendido e novos estudos laboratoriais serão necessários para elucidar essa questão. Estudos de evolução viral, baseados em taxas de substituições de herpesvírus (Herbst et al. 2004; Patrício et al., 2012), indicam que a taxa de mutação entre os herpesvírus é lenta e, portanto, novos estudos deverão elucidar se isto também ocorre entre os ChHV5.

A análise filogenética foi inferida após comparação com amostras provenientes da Austrália, Barbados, Costa Rica, Flórida, Havaí, México, San Diego, Porto Rico, Golfo da Guiné e amostras provenientes dos estados brasileiros da Bahia, Ceará, Espírito Santo e São Paulo. Ao serem alinhadas, as sequências dos dois perfis (tipo-1 e tipo-2) agruparam-se por similaridade junto às amostras provenientes de Porto Rico e Golfo da Guiné, consideradas por Patrício et al. (2012) como amostras do grupo filogeográfico do Atlântico.

Os dados obtidos no presente estudo revelaram uma similaridade com um valor de *bootstrap* de 85% e sustenta a validade desta inferência (Figura 24). As sequências gênicas brasileiras descritas anteriormente por Rodenbusch (2013), provenientes dos estados de São Paulo (JN938587 e JN938584) e do Espírito Santo (JN938586), também compartilharam o mesmo clado. Apesar da sequência tipo-1 também pertencer ao grupo filogeográfico do Atlântico, por possuir uma substituição de nucleotídeo, apenas se agrupa com a sequência gênica proveniente de São Paulo (JN938585), somente relatada, até o presente, em águas brasileiras. As outras amostras brasileiras descritas (Rodenbusch et al., 2014) provenientes dos estados da Bahia (JN938588) e do Ceará (JN938589) compartilham similaridades com amostras da Flórida e do Havaí com os variantes A, B e C da Flórida descritas por Ene et al., (2005), como também com as amostras de Barbados e uma amostra de Porto Rico, que fazem parte do grupo filogeográfico Atlântico- oeste/Leste do Caribe descrito por Patrício et al., (2012). Esta similaridade foi sustentada por um valor de 99% bootstrap value.

A amostra proveniente do estado da Bahia, embora faça parte desse mesmo grupo, segundo Rodenbusch et al., (2012), em nossa análise ela se mantém isolada em outro clado, embora com apoio baixo de 50% de bootstrap. Provavelmente essa mudança de posição observada só poderá ser atestada se novos estudos de outros genes forem realizados para confirmarem a real posição na árvore e refletirem ainda a verdadeira posição geográfica da amostra, como ocorreu com algumas amostras de Porto Rico e Austrália (Patrício et al., 2012). Dependendo do gene analisado, as amostras PR1, PR3 e AUS1 também mudaram de ramos, entre árvores de genes analisados, correspondendo a diferentes localizações geográficas em cada árvore de genes e por isso foram removidas das análises posteriores nos estudos de evolução viral.

Com exceção dessa única amostra, embora nossos resultados concordem com os dados obtidos em dois anos por Rodenbusch et al., (2012), nos anos, 2008 e 2010, o presente estudo reforça a hipótese de homogeneidade de vírus na região de Ubatuba, onde apenas dois tipos de vírus circularam nas águas do litoral norte, no período analisado. Entretanto, cabe salientar que nossas análises basearam-se em uma amostragem bem mais ampla, em um período de dez anos, e podem possivelmente refletir o real fluxo de genes nessas áreas.

Os dois grupos remanescentes, Centro-oeste do Pacífico e Pacífico leste, também coincidem com os resultados obtidos por Patrício et al., (2012).

Os animais deste estudo que apresentaram ChHV5 em mais do que um tipo de material coletado, mostraram que o mesmo vírus estava presente nas diferentes secreções, uma vez que o perfil gênico das sequências obtidas era idêntico entre si, descartando assim a possibilidade de mistura de vírus nessas amostras.

Apesar do genoma completo do ChHV5 ter sido recentemente sequenciado (Ackermann et al., 2012), e várias sequências parciais mundiais desse vírus terem sido disponibilizadas, ainda pouco se conhece do ChHV5 e da circulação desses vírus no globo. Várias hipóteses foram levantadas sobre o ChHV5 e seus hospedeiros até o presente.

Patrício et al., (2012) estabeleceram que as variantes de Porto Rico e do Golfo da Guiné estavam intimamente relacionadas, sugerindo um fluxo recente do vírus entre essas regiões. Esta conexão, segundo esses autores, embora inicialmente inesperada considerando a distância geográfica entre os dois locais, poderia ser explicada pela forte corrente equatorial do Golfo da Guiné para o Brasil, com o seu braço norte em direção às Antilhas, conhecida por influenciar a dispersão e distribuição de filhotes de tartarugas marinhas (Lahanas et al., 1998). Além disso,

estudos de genética populacionais baseados em análises da região do DNA mitocondrial de tartarugas verdes indicaram a presença de haplótipos compartilhados entre baías de forrageamento porto-riquenhas e viveiros do Oeste Africano (Velez-Zuazo et al., 2010). Uma hipótese plausível é que os indivíduos infectados com ChHV5 em locais de forrageamento de Porto Rico poderia voltar para a sua casa natal, no Golfo da Guiné, facilitando o fluxo de genes de vírus (Patrício et al., 2012).

Os nossos dados corroboram com os resultados obtidos por Patrício et. al (2012) e concordam com o fluxo dos vírus entre o Brasil, a África e Porto Rico. Esta hipótese também pode ser explicada pelos estudos de população das tartarugas marinhas no Brasil.

Naro-Maciel et al., (2007), observaram que duas subpopulações de tartarugas verdes são mais frequentes em Ubatuba e estão relacionadas aos haplótipos das populações de tartarugas verdes encontradas nas áreas de reprodução do Suriname, da Ilha de Aves (Venezuela), da Costa Rica, Trindade (Brasil), Ascensão (África), Atol das Rocas, Bioko e Guiné Bissau.

A conectividade primária entre a Ilha de Trindade e o Brasil e possíveis ligações entre tartarugas verdes do Brasil e África foi apontada por Naro-Maciel et al., em 2012, embora inconclusivamente.

Atualmente, estudos de genética populacional, baseados em análises filogenéticas utilizando diferentes marcadores moleculares, reforçam essa hipótese (Naro-Maciel et al., 2012, 2014). Como considerado por Naro-Maciel et al., (2014) a existência de uma forte barreira de isolamento geográfico poderia influenciar o deslocamento de estoques mistos de tartarugas verdes impulsionando alguns animais vindos do continente africano em direção ao Caribe e outra porção para a região sudeste do Brasil.

Em outro estudo, Putman e Naro-Maciel (2014), baseado em deslocamento de partículas virtuais, confirma a conectividade desses animais entre Brasil e África, incluindo a região de Ubatuba, São Paulo.

Essas observações corroboram os resultados obtidos do presente trabalho e as hipóteses aqui levantadas.

Os dados do presente estudo poderão contribuir para o estudo da fibropapilomatose e dos ChHV5 em tartarugas marinhas e novas medidas no manejo poderão ser adotadas frente as hipóteses aqui apresentadas. O entendimento das rotas migratórias desses animais e análises filogenéticas de outros genes e de outras áreas geográficas poderão elucidar a distribuição global desses agentes e contribuir para o entendimento da história evolutiva do ChHV5.

6 CONCLUSÃO

- As massas tumorais analisadas histologicamente mostraram-se características da fibropapilomatose.
- As alterações histopatológicas observadas confirmaram o padrão descrito na literatura mundial. A frequência das principais alterações histopatológicas foram comparáveis aos dados da literatura.
- A reação de PCR e *nested*-PCR possibilitaram a detecção do DNA viral de ChHV5 nos tecidos tumorais, nas secreções oculares e na saliva das tartarugas verdes analisadas.
- As sequências de nucleotídeos obtidas mostraram-se tratar-se dos ChHV5. Dois tipos de sequências gênicas foram detectadas e denominadas Tipo 1 e Tipo 2.
- As sequências identificadas agruparam-se no grupo filogeográfico do Atlântico.
- As substituições dos resíduos de aminoácidos encontradas revelaram tratar-se de substituição não sinônima.

REFERÊNCIAS*

- Ackermann M, Koriabine M, Hartmann-Fritsch F, de Jong PJ, Lewis TD, Schettle N, et al. The genome of chelonid herpesvirus 5 harbors atypical genes. PLoS One. 2012;7:e46623.
- Adnyana W, Ladds PW, Blair D. Observations of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*). Aust Vet J. 1997;75, 737–42.
- Aguirre AA, Balazs GH, Spraker TR. Spirorchidiasis and fibropapillomatosis in Green turtles from the Hawaiian Island. J Wildl Dis. 1998;34, 91-5.
- Aguirre AA, Limpus CJ, Spraker TR, Balazs GH. Survey of fibropapillomatosis and other potential diseases in marine turtles from Moreton Bay, Queensland, Australia. Proc 19th Int Sea Turt Symp US NOAA Tech Memo NMFS-SEFSC-443. 2000;36.
- Aguirre AA, Lutz P. Marine Turtles as Sentinels of Ecosystem Health: Is Fibropapillomatosis an Indicator? Ecohealth. 2004;1:275–83.
- Alfaro-Núñez A, Frost Bertelsen M, Bojesen AM, Rasmussen I, Zepeda-Mendoza L, Tange Olsen M, et al. Global distribution of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus among clinically healthy sea turtles. BMC Evol Biol. 2014;14:206-12.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 1997;215:403-10.
- Arthur K, Limpus C, Balazs G, Capper A, Udy J, Shaw G, et al. The exposure of green turtles (*Chelonia mydas*) to tumour promoting compounds produced by the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* and their potential role in the aetiology of fibropapillomatosis. Harmful Algae. 2008;7:114–25.
- Arthur K, Shaw G, Limpus C, Udy J. A review of the potential role of tumour-promoting compounds produced by *Lyngbya majuscula* in marine turtle fibropapillomatosis. African Journal of Marine Science. 2006; 28: 441–6.
- Balazs GH. Current status of fibropapillomas in the Hawaiian green turtle, *Chelonia mydas*. In: Balazs, G. H., Pooley, S. G. (eds) Research plan for marine turtle fibropapilloma. U. S. Department of Commerce, National Oceanographic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service. NOAA-TM-NMFS-SWFSC. 1991;156:47-57.

Balazs GH, Murakawa SKK, Ellis DM, Aguirre AA. Manifestation of fibropapillomatosis of green turtles at Kaneohe Bay in the Hawaiian islands. Proceedings of the Eighteenth Annual Symposium on the Sea Turtle Biology and Conservation, Mazatlan, Mexico. 1998;3-7.

Baptistotte C. Caracterização espacial e temporal da fibropapilomatose em tartarugas marinhas da costa brasileira. [Tese (Doutorado em Ecologia Ambiental)]. Escola de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo; 2006.

Baptistotte C, Scalfone JT, Gallo BMG, Santos AS, Castilhos JC, Lima EHSM, Bellini C, Barata PCR.. Prevalence of sea turtle fibropapillomatosis in Brazil. Proceedings of the Twenty-first Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC, Pennsylvania U.S, 2001. p. 24-8.

Blackbourn DJ, Lennette ET, Ambroziak J, Mourich DV, Levy JA. Human herpesvirus 8 detection in nasal secretions and saliva. J Infect Dis. 1998;177:213–6.

Benson D A, Karsch-Mizrachi I, Clark K, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. Nucleic Acids Res. 2012;40:48–53.

Bjorndal KA. Biology and Conservation of Sea Turtles. Smithsonian Institution Press, Washington. 1995.

Blackbourn DJ, Lennette ET, Ambroziak J, Mourich D V, Levy J a. Human herpesvirus 8 detection in nasal secretions and saliva. J Infect Dis. 1998;177:213–6.

Brooks DE, Ginn PE, Miller TR, Bramson L, Jacobson ER. Ocular Fibropapillomas of Green Turtles (*Chelonia mydas*). Vet Pathol. 1994;31:335–9.

Casey RNQ. Evidence for retrovirus infections in green turtles *Chelonia mydas* from the Hawaiian islands. Dis Aquat Organ. 1997;31:1–7.

Chaloupka M, Balazs GH, Work, TM. Rise and fall over 26 years of a marine epizootic in Hawaiian green sea turtles. J Wildl Dis. 2009;45:1138–42.

Chaloupka M, Bjorndal KA, Balazs GH, Bolten AB, Ehrhart LM, Limpus CJ, Suganuma H, Troëng S, Yamaguchi M. Encouraging outlook for recovery of a once severely exploited marine megaherbivore. Global Ecol and Biogeo. 2008;17: 297–304.

Chaloupka M, Work TM, Balazs GH, Murakawa SKK, Morris R. Cause-specific temporal and spatial trends in green sea turtle strandings in the Hawaiian Archipelago (1982–2003). Mar Biol. 2008;154:887–98.

Coberley SS, Condit RC, Herbst LH, Klein PA. Identification and expression of immunogenic proteins of a disease-associated marine turtle herpesvirus. *J Virol.* 2002;76:10553–8.

Cohen P, Holmes CF, Tsukitani Y. Okadaic acid: A new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci.* 1990;15:98–102.

Curry SS, Brown DR, Gaskin JM, Jacobson ER, Ehrhart LM, Blahak S, et al. Persistent infectivity of a disease-associated herpesvirus in green turtles after exposure to seawater. *J Wildl Dis.* 2000;36:792–7.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models new heuristics and parallel computing *Nat Methods.* 2012;9:772.

Davison AJ. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol.* 2010;143:52–69.

dos Santos RG, Martins AS, Torezani E, Baptistotte C, da Nóbrega FJ, Horta PA, et al. Relationship between fibropapillomatosis and environmental quality: a case study with *Chelonia mydas* off Brazil. *Dis Aquat Organ.* 2010;89:87–95.

Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:1792–7.

Ehrhart LM. Fibropapillomas in green turtles of the Indian River lagoon Florida: distribution over time and area NOAA-TM-NMFS-SWFSC. 1991;156: 59-61.

Ene A, Su M, Lemaire S, Rose C, Schaff S, Moretti R, et al. Distribution of chelonid fibropapillomatosis-associated herpesvirus variants in Florida: molecular genetic evidence for infection of turtles following recruitment to neritic developmental habitats. *J Wildl Dis.* 2005;41:489–97.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego: Elsevier Academic Press; 2005. paginas 500 p.

Flint M, Limpus CJ, Patterson-Kane JC, Murray PJ, Mills PC. Corneal fibropapillomatosis in green sea turtles (*Chelonia mydas*) in Australia. *J Comp Path* 2010;142:341–6.

Flint M, Patterson-Kane JC, Limpus CJ, Mills PC. Health surveillance of stranded Green turtles in southern Queensland Australia (2006–2009): An epidemiological analysis of causes of disease and mortality. *Ecohealth.* 2010;7:135–45.

Foley AM, Schroeder B a, Redlow AE, Fick-Child KJ, Teas WG. Fibropapillomatosis in stranded green turtles from the eastern united states (1980-98):trends and associations with environmental factors. J Wildl Dis. 2005;41:29–41.

Formia A, Deem S, Billes A, Ngouesso SR, Parnell R, Collins T, Sounguet G, Gibudi A, Villarubia A, Balazs G, Spraker T. Fibropapillomatosis confirmed in *Chelonia mydas* in the Gulf of Guinea West Africa. Mar Turt Newslet. 2007;116: 20-2.

Gallo BMG, Macedo S, Giffoni BB, Becker JH, Barata PCR. Sea Turtle Conservation in Ubatuba Southeastern Brazil a Feeding Area with Incidental Capture in Coastal Fisheries. Chelonian Conserv Biol. 2006;5:93-101.

Greenblatt RJ, Quackenbush SL, Rufina N, Rovnak J, Balazs GH, Work TM, et al. Genomic Variation of the Fibropapilloma-Associated Marine Turtle Herpesvirus across Seven Geographic Areas and Three Host Species Genomic Variation of the Fibropapilloma-Associated Marine Turtle Herpesvirus across Seven Geographic Areas and Three Host Species. J Virol. 2005;79:1125-32.

Greenblatt RJ, Work TM, Dutton P, Sutton C a, Spraker TR, Casey RN, et al. Geographic variation in marine turtle fibropapillomatosis. J Zoo Wildl Med. 2005;36:527–30.

GBRMPA 2014. A Vulnerability Assessment for the Great Barrier Reef: Marine Turtles Great Barrier Reef Marine Park. Authority Townsville.

Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol. 2010;27: 221-4.

Greenblatt RJ, Quackenbush SL, Casey RN, Rovnak J, Balazs GH, Work TM, Casey JW, Sutton CA. Genomic Variation of the Fibropapilloma-Associated Marine Turtle Herpesvirus across Seven Geographic Areas and Three Host Species. J Virol. 2005;79: 1125-32.

Greenblatt RJ, Work T, Balazs GH, Sutton CA, Casey JW, Casey RN. The *Ozobranchus* leech is a candidate mechanical vector for the fibropapilloma- associated turtle herpesvirus found latently infecting skin tumors on Hawaiian Green turtles (*Chelonia mydas*). Virology. 2004;321:101–10.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 30. Syst Biol. 2010;59:307-21.

Hawkes LA, Broderick AC, Godfrey MH, Godley BJ. Climate change and marine turtles Endangered Species. Research. 2009;7:137–54.

Haystead TAJ, Sim ATR, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P, Hardie DG. Effects of the tumor promoter okadaic acid on intracellular protein- phosphorylation and metabolism. Nature. 1989;337:78–81.

Herbst LH. Fibropapillomatosis of marine turtles. Ann Ver Fish Dis. 1994;4:389–425.

Herbst L, Ene A, Su M, Desalle R, Lenz J. Tumor outbreaks in marine turtles are not due to recent herpesvirus mutations. Curr Biol. 2004;14:697–9.

Herbst LH, Klein P A. Green turtle fibropapillomatosis: challenges to assessing the role of environmental cofactors. Environ Health Perspect. 1995;103:27–30.

Herbst LH. Comparative pathology and pathogenesis of spontaneous and experimentally induced fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). Vet Pathol. 1999;36:551–64.
Checar se tem mais autores

Herbst LH, Jacobson ER, Klein PA, Balazs GH, Moretti R, Brown T, Sundberg JP. Comparative pathology and pathogenesis of spontaneous and experimentally induced fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). Vet Pathol. 1999;36:551–64.

Herbst L, Jacobson E, Moretti R, Brown T, Sundberg J, Klein P. Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. Dis Aquat Organ. 1995;22:1–12.

Herbst LH, Lemaire S, Ene AR, Heslin DJ, Ehrhart LM, Bagley DA, Klein PA, Lenz J. Use of baculovirus-expressed glycoprotein H in an enzyme-linked immunosorbent assay developed to assess exposure to chelonid fibropapillomatosis-associated herpesvirus and its relationship to the prevalence of fibropapillomatosis in sea turtles. Clin Vaccine Immunol. 2008;15:843–51.

Hirama S, Ehrhart LM, Rea LD, Kiltie R a. Relating fibropapilloma tumor severity to blood parameters in green turtles *Chelonia mydas*. Dis Aquat Organ. 2014;111:61–8.

Huerta P, Pineda H, Aguirre A, Spraker T, Sarti L, Barragan A. First confirmed case of fibropapilloma in a Leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) In: Proceedings of the 20th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation 29 February–4 March 2000 Orlando Florida USA US Department of Commerce National Oceanographic and Atmospheric Administration National Marine Fisheries Service Miami Florida. 2002. p 193.

Jacobson ER, Buergelt C, Williams B, Harris RK.. Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green turtle *Chelonia mydas*. Dis Aquat Org. 1991;12:1-6.

Jacobson ER, Mansell JL, Sundberg JP, Hajar L, Reichmann MM, Ehrhart LM, Walsh M, Murru F. Cutaneous fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). J Comp Pathol.1989;101:39-52.

Jones K, Ariel E, Burgess G, Read M. A review of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*). Vet J. 2016;212:48–57.

Kang KI, Torres-Velez FJ, Zhang J, Moore P A, Moore DP, Rivera S, Brown CC. Localization of fibropapilloma-associated turtle herpesvirus in green turtles (*Chelonia mydas*) by in-situ hybridization. J Comp Pathol. 2008;139: 218–25.

Lackovich JK, Brown DR, Homer BL, Garber RL, Mader DR, Moretti RH, Patterson AD, Herbst LH, Oros J, Jacobson ER, Curry SS, Klein PA. Association of herpesvirus with fibropapillomatosis of the green turtle *Chelonia mydas* and the loggerhead turtle *Caretta caretta* in Florida. Dis Aquat Org.1999;37:89-97.

Landsberg J, Balazs G, Steidinger K, Baden D, Work T, Russell D. The Potential Role of Natural Tumor Promoters in Marine Turtle Fibropapillomatosis. J Aquat Anim Health. 1999;11:199–210.

Limpus CJ, Miller JD. 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? J Aquat Anim Health. 1994;6: 70-8.

Lu Y, Nerurkar VR, Aguirre AA, Work TM, Balazs GH, Yanagihara R. Establishment and characterization of 13 cell lines from a Green turtle (*Chelonia mydas*) with fibropapillomas. In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal.1999; 35: 389–93.

Lu Y, Wang Y, Yu Q, Aguirre A A, Balazs GH, Nerurkar VR, Yanagihara R. Detection of herpesviral sequences in tissues of green turtles with fibropapilloma by polymerase chain reaction. Arch Virol. 2000;145:1885–93.

Lu Y, Wang Y, Yu Q, Aguirre a a, Balazs GH, Nerurkar VR, et al. Detection of herpesviral sequences in tissues of green turtles with fibropapilloma by polymerase chain reaction. Arch Virol. 2000;145:1885–93.

Luckes B. Studies on tumors in cold-blooded vertebrates. Annual Report of Tortugas Laboratory of the Carnegie Institute Washington DC USA. 1938:92–4.

Lutz PL, Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stamler JS. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *The Biology of Sea Turtles*. Hoboken: CRC Press;1994. v. 2, p. 2002.

Markine-Goriaynoff N, Gillet L, Van Etten JL, Korres H, Verma N, et al. Glycosyltransferases encoded by viruses. *J Gen Virol*. 2004;85: 2741–54.

Matushima ER, Longatto-Filho A, Di Loretto C, Kanamura CT, Ramos MCC, Sinhorini IL, Gallo B. Cutaneous papillomas of green turtles: a morphological ultra-structural and immunohistochemical study in Brazilian specimens. *Brazilian J Vet Res Anim Sci*. 2001;38: 51–4.

Mehnert DU, Monezi TA, Muller NMG, Costa SM, Batlouni SR, Borella MI, Harsi CM, Candeias JMG, Baptistotte C, Matushima ER. Etiological study of fibropapillomatosis in Green turtles *Chelonia mydas*. *Viral agents Virus Reviews & Research*. 2002;1:34.

Monezi TA, Muller NMG, Matushima ER, Rossi S, Werneck MR, Mehnert DU. Detecção de herpesvírus em tumor e sangue de tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas* mantidas na base do projeto Tamar Ubatuba-SP nos anos de 2005 e 2006. VIII Congress of the Brazilian Association of Wildlife Veterinarians - XIII Meeting of the Brazilian Association of Wildlife Veterinarians. São Pedro: SBV; 2006. 230

Moore MK, Work TM, Balazs GH, Docherty DE. Preparation cryopreservation and growth of cells prepared from the Green turtle (*Chelonia mydas*). *Methods in Cell Science*. 1997;19:161–8.

Murakawa SKK, Balazs GH, Ellis DM, Hau S, Eames SM. Trends in fibropapillomatosis among Green turtles stranded in the Hawaiian Islands 1982–98. In: *Proceedings of the Nineteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. South Padre Island Texas USA.1999/2000. p. 239–41.

Naro-Maciel E, Becker JH, Lima EHSM, Marcovaldi, M A, De Salle R. Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. *J Hered*. 2007;98: 29–39.

Naro-Maciel E, Bondioli ACV, Martin M, Almeida AP, Baptistotte C, Bellini C, Marcovaldi MA, Santos AJB, Amato G. The interplay of homing and dispersal in green turtles: A focus on the southwestern atlantic. *J Hered*. 2012; 103:792–5.

Naro-Maciel E, Reid B N, Alter SE, Amato G, Bjorndal KA, Bolten AB, Martin M, Nairn C J, Shamblin B, Pineda-Catalan O. From refugia to rookeries: Phylogeography of Atlantic green turtles. *J Exp Mar Bio Ecol.* 2014;461:306–16.

Neilan JG, Borca MV, Lu Z, Kutish GF, Kleiboeker SB, et al. An African swine fever virus ORF with similarity to C-type lectins is non-essential for growth in swine macrophages in vitro and for virus virulence in domestic swine. *J Gen Virol.* 1999;80: 2693–7.

Nigro O, Aguirre AA, Lu Y. Nucleotide sequence of an ICP185 assembly protein (UL28) gene of Green turtle herpesvirus pathogenically associated with Green turtle fibropapilloma. *Journal of Virological Methods.* 2004;120:107–12.

Norton T M, Jacobson E R, Sundberg J P. Cutaneous fibropapillomas and renal myxofibroma in a green turtle *Chelonia mydas*. *J Wildl Dis.* 1990;26:265-70.

Page-karjian A, Norton TM, Ritchie B, Brown C, Mancía C, Jackwood M, et al. Quantifying chelonid herpesvirus 5 in symptomatic and asymptomatic rehabilitating green sea turtles. *Endanger Species Res.* 2015;28:135–46.

Page-Karjian A, Norton TM, Krimer P, Groner M, Steven EN, Jr Gottdenker NL. Factors influencing survivorship of rehabilitating green sea turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine.* 2014; 45: 507–19.

Page-Karjian A, Torres F, Zhang J, Rivera S, Diez C, Moore P a, et al. Presence of chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus in tumored and non-tumored green turtles, as detected by polymerase chain reaction, in endemic and non-endemic aggregations, Puerto Rico. *Springerplus.* 2012;1:35-38.

Patricio AR, Herbst LH, Duarte AV, Ximena SL, Nuno P, Nuno T, Luis T, Gary A. Global Phylogeography and Evolution of the Chelonid Fibropapilloma-associated Herpesvirus. *J Gen Virol.* 2012;93:1035-45.

Pellet P, Roizmann B. The family Herpesviridae: A brief introduction In: Fields BN Knipe, DM Howley. PM (Eds) *Fields' Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 33-333.

Peranzoni E, Marigo ,I Dolcetti L, Ugel S, Sonda N, Taschin E, Mantelli B, Bronte V, Zanovello P. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology *Immunobiology.* 2008;212:795–12.

Poloczanska ES, Limpus CJ, Hays GC. Vulnerability of marine turtles to climate change *Advances in Marine Biology.* 2010;56:151–11.

Putman NF, Naro-maciel E. Finding the “lost years” in green turtles: insights from ocean circulation models and genetic analysis. *Proc R Soc London*. 2015;280: 20131468.

Quackenbush SL, Casey RN, Murcek RJ, Paul TA, Work TM, Limpus CJ, Chaves A, duToit L, Perez JV, Aguirre AA, Spraker TR, Horrocks JA, Vermeer LA, Balazs GH, Casey JW. Quantitative Analysis of Herpesvirus Sequences from Normal Tissue and Fibropapillomas of Marine Turtles with Real-Time PCR. *Virology*. 2001;287:106-11.

Quackenbush SL, Work TM, Balazs GH, Casey RN, Rovnak J, Chaves A, Toit L, Baines JD, Parrish CR, Bowser PR, Casey JW. Three closely related herpesviruses are associated with fibropapillomatosis in marine turtles. *Viol*. 1998;246:392-9.

Rebell G, Rywlin A, Haines H. A herpesvirus-type agent associated with skin lesions of green sea turtles in aquaculture. *Am J Vet Res*. 1975;36:1221–4.

Rodenbusch CR, Almeida LL, Marks FS, Ataíde MW, Alievi MM, Tavares M, Pereira RA, Canal CW. Detection and characterization of fibropapilloma associated herpesvirus of marine turtles in Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesq Vet Bras*. 2012; 32:1179–83.

Rodenbusch C, Baptistotte C, Werneck M, Pires T, Melo M, de Ataíde M, et al. Fibropapillomatosis in green turtles *Chelonia mydas* in Brazil: characteristics of tumors and virus. *Dis Aquat Organ*. 2014;111:207–17.

Rodenbusch CR, Baptistotte C, Werneck MR, Pires TT, Melo MT, de Ataíde MW, dos Reis KDL, Testa P, Alieve MM, Canal CW. Fibropapillomatosis in green turtles *Chelonia mydas* in Brazil: characteristics of tumors and virus. *Dis Aquat Org*. 2014;111: 207-17.

Rossi S. Análise da atividade de leucócitos e de bifenilas policloradas aplicada ao estudo da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (Testudines Cheloniidae) (Linnaeus 1758) PhD thesis University of São Paulo College of Agriculture "Luiz de Queiroz" Piracicaba Brazil. 2014,167p.

Sandmeyer LS, Waldner CL, Bauer BS, Wen X, Bienzle D. Comparison of polymerase chain reaction tests for diagnosis of feline herpesvirus *Chlamydomydia felis* and *Mycoplasma* spp infection in cats with ocular disease in Canada. *Can Vet J*. 2010; 5:1629-33.

Santos RG, Martins AS, Farias JDN, Horta PA, Pinheiro HT, Torezani E, et al. Coastal habitat degradation and green sea turtle diets in Southeastern Brazil. *Mar Pollut Bull*. 2011;62:1297–302.

Smith GM, Coates CW. Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles *Chelonia mydas* (Linnaeus). Zoologica. 1938;23:93–8.

Stacy BA, Wellehan JFX, Foley AM, Coberley SS, Herbst LH, Manire CA, Garner MM, Jacobson E R. Two herpesviruses associated with disease in wild Atlantic loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). Vet Microbiol.2008;126: 63-3.

Suganuma M, Sugimura T, Fujiki H, Suguri H, Yoshizawa S, Hirota M, Nakayasu M, Ojika M, Wakamatsu K, Yamada K. 1988; Okadaic acid: An additional.

Tagliolatto, A.; Guimarães, S.; Vidal, A.; Monteiro, C.; Lobo-hajdu, G.; Gitirana, H. Evidência fotográfica de regressão de fibropapilomas em tartarugas-verdes *Chelonia mydas* em Itaipu, Rio de Janeiro, Brasil. In: Jornada, 6.; Reunión de conservación e investigación de tortugas marinas en el atlántico sur occidental (ASO). Piriápolis. Resúmenes. CICMAR- DINARA, 2013;7:72-6.

Van Houtan KS, Hargrove SK, Balazs GH. Land use macroalgae and a tumor-forming disease in marine turtles. PLoS ONE. 2010;5,e12900.

Van Houtan KS, Smith CM, Dailer ML, Kawachi M. Eutrophication and the dietary promotion of sea turtle tumors. PeerJ. 2014;2,e602.

VanDevanter DR, Warrener P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, et al. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. J Clin Microbiol. 1996;34:1666–71.

Voigt S, Sandford GR, Ding L, Burns WH Identification and characterization of a spliced C-type lectin-like gene encoded by rat cytomegalovirus. J Virol. 2001;75:603–11.

Wilcock D, Duncan SA, Traktman P, Zhang WH, Smith GL () The vaccinia virus A4OR gene product is a nonstructural, type II membrane glycoprotein that is expressed at the cell surface. J Gen Virol. 1999;80:2137– 48.

Williams EH, Rueda-Almonacid JV, Sybesma J, De Calventi IB, Boulon RH, Bunkley-Williams L, Peters EC, Pinto-Rodriguez B, Matos-Morales R, Mignucci-Giannoni AA et al . An epizootic of cutaneous fibropapillomas in Green turtles *Chelonia mydas* of the Caribbean: Part of a panzootic? Journal of Aquatic Animal Health. 1994;6: 70–8.

Work TM, Balazs GH, Rameyer RA, Morris RA. Retrospective pathology survey of Green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis in the Hawaiian Islands 1993–2003. Diseases of Aquatic Organisms. 2004; 62:163–76.

Work TM, Balazs GH, Wolcott M, Morris R. Bacteraemia in free-ranging Hawaiian Green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis. Diseases of Aquatic Organisms. 2003;53:41–6.

Work T M, Dagenais J, Balazs G H, Schumacher J, Lewis T D, Leong JC, Casey RN, Casey JW. *In vitro* biology of fibropapilloma-associated turtle herpesvirus and host cells in Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). J Gen Virol. 2009;90:1943-50.

Work TM, Dagenais J, Balazs GH, Schettle N, Ackermann M. Dynamics of Virus Shedding and In Situ Confirmation of Chelonid Herpesvirus 5 in Hawaiian Green Turtles With Fibropapillomatosis. Vet Pathol. 2014;1-8.

Work TM, Rameyer RA Balazs GH, Cray C, Chang SP. Immune status of free-ranging Green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii. J Wildl Dis. 2001;37: 574.

Yu Q, Hu N, Lu Y, Nerurkar V R, Yanagihara R. Rapid acquisition of entire DNA polymerase gene of a novel herpesvirus from green turtle fibropapilloma by a genomic walking technique. J Virol Meth. 2001;91:183-95.

Zwarg T, Rossi S, Max R, Matushima ER. Hematological and histopathological evaluation of wildlife green turtles. 2014;34:682–8.

Zwickl D J. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. [Dissertation (Master thesis in Informatic)] The University of Texas at Austin; 2006.

ANEXOS

ANEXO A

A – Tabela – Biometria das tartarugas verdes coletadas no período de dez anos em Ubatuba, SP.

Tartarugas	CCC (cm)	LCC (cm)	MC (Kg)
R02.05	38	35,5	7
R03.05	41,5	37,5	5
R04.05	39,2	36	7,5
R05.05	42,5	39	9,5
R06.05	39	35	5,5
R01.06	34	30	3,5
R02.06	39,5	37	8
R03.06	44	41	7
R04.06	68,5	63	35
R05.06	42,5	36,5	8,5
R06.06	41	36	7,5
R07.06	58	53	23
R08.06	57	50	16
R09.06	40,5	38	8
R10.06	39,5	35	8
R15.06	36,5	33	6,5
R16.06	49,5	45	13
R17.06	47	44,5	13,5
R18.06	33,5	31	4
R19.06	64,5	61,5	30
R20.06	39,5	34,5	7
R22.06	47	42	10
R23.06	56	50	20
R24.06	35	31	5
R01.11	43	40	7
R02.11	34,2	31	5
R03.11	34	32	4
R04.11	41	36,8	8
R09.11	37	32	7
R10.11	44	41,5	12
R11.11	62	59	30
R17.11	34,5	31	6
R18.11	57,5	52,5	12,6
R02.12	34,4	32,7	5
R03.12	37	34	6
R04.12	35,5	29,4	5
R05.12	57,8	52,5	22
R06.12	59,5	52	26

ANEXO B

B – Publicação in Veterinary Microbiology. 2016;186:150-6. *Chelonid herpesvirus 5* in secretions and tumor tissues from green turtles (*Chelonia mydas*) from Southeastern Brazil: A ten-year study.

Veterinary Microbiology 186 (2016) 150–156

ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Short communication

Chelonid herpesvirus 5 in secretions and tumor tissues from green turtles (*Chelonia mydas*) from Southeastern Brazil: A ten-year study

CrossMark

Telma A. Monezi^{a,b,*}, Dolores U. Mehnert^a, Elisabeth M.M. de Moura^a,
Natascha M.G. Müller^a, Patrícia Garrafa^a, Eliana R. Matushima^c, Max R. Werneck^d,
Maria I. Borella^b

^a University of São Paulo, Institute of Biomedical Sciences, Department of Microbiology, Brazil
^b University of São Paulo, Institute of Biomedical Sciences, Department of Cell and Developmental Biology, Brazil
^c University of São Paulo, College of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Pathology, Brazil
^d Projeto TAMAR-ICMBIO, Ubatuba, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 February 2015
Received in revised form 15 February 2016
Accepted 23 February 2016

Keywords:
Brazil
Chelonia mydas
ChHV5
Fibropapillomatosis
Secretions
Ocular fibropapillomatosis

ABSTRACT

Fibropapillomatosis (FP), a neoplastic disease characterized by the formation of multiple tumors affecting different species of sea turtles and, most often, the green turtle (*Chelonia mydas*), is considered one of the major threats to the survival of this species. Recent studies indicate that Chelonid herpesvirus (ChHV5) is the etiological agent of this disease, though its association with anthropogenically altered environments and the immune status of these animals also appears to contribute to disease expression and tumor formation. In this study, tumor biopsy and secretions from green turtles captured off the coast of São Paulo State, Brazil, were used in histological and molecular analyses to detect and characterize circulating ChHV5. In 40.9% of cases, the tumor histopathological findings revealed focal ballooning degeneration with intranuclear inclusion bodies, results which are suggestive of viral infection. ChHV5 was detected using polymerase chain reaction (PCR) on the animals' skin, ocular tumor biopsies, and ocular and oral secretions. The analysis of the detected ChHV5 sequences revealed two distinct genetic sequences together. Phylogenetic analysis indicated that Brazilian samples were similar to ChHV5 samples described for the Atlantic phylogeographic group and are therefore part of the same clade as the Gulf of Guinea and Puerto Rico samples. This similarity suggests a possible flow of the virus between these three regions.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.