**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

**Ecologia, prevalência e caracterização molecular de *Chelonid
fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) em Tartarugas verdes
(*Chelonia mydas*) em áreas da costa brasileira**

Marco Aurélio Gattamorta

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ecologia Aplicada

Piracicaba
2015

Marco Aurélio Gattamorta
Biólogo

Ecologia, prevalência e caracterização molecular de *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) em Tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) em áreas da costa brasileira

Orientador:
Profa. Dra. **ELIANA REIKO MATUSHIMA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ecologia Aplicada

**Piracicaba
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Gattamorta, Marco Aurélio

Ecologia, prevalência e caracterização molecular de *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) em Tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) em áreas da costa brasileira / Marco Aurélio Gattamorta. -- Piracicaba, 2015.
122 p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

1. *Chelonia mydas* 2. CFPHV 3. Latência 4. Replicação viral 5. mtDNA
6. Fibropapilomatose I. Título

CDD 639.392
G262e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais,

À natureza e sua insistência em tornar esse planeta mais bonito e elegante

AGRADECIMENTOS

À esta força maior que chamamos de Deus e que a ciência não explica. Obrigado por tornar possível coisas que pareciam impossíveis.

Aos meus pais, Sebilio Gattamorta e Lusía Fonseca Gattamorta, pelo amor que nunca faltou, pelo apoio às minhas decisões, mesmo sem entendê-las, por tolerar minhas longas ausências, por valorizar e estimular minha educação. A vocês, meu amor, reconhecimento e respeito. Obrigado!

Ao Jonas Nogueira Júnior, minha família em São Paulo e com quem pude contar em todos os momentos deste doutorado. Sou eternamente grato a você.

À minha orientadora, Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, pelo carinho e amizade de anos, pela confiança em aceitar me orientar após longo período fora da academia, pela paciência com os meus prazos e pelo apoio científico, logístico e psicológico na orientação desta tese. Matu, muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, por permitir o desenvolvimento deste trabalho no LABMAS, pela receptividade constante em me atender e sanar minhas dúvidas, pelo suporte científico fundamental para que esta tese fosse gerada.

À Dra. Ana Cristina Vigliar Bondioli, por ter aberto as portas da sua casa para um desconhecido, ter acreditado neste projeto, ter me dado conselhos científicos fundamentais e pelo carinho e suporte constante em nossos encontros.

À Fabíola Eloísa Setim Prioste, pelo apoio, amizade e ajuda inestimável nas viagens de coletas e nas fotos.

À Juliana Costa Jordão, pela amizade, prestatividade e ensinamentos fundamentais no início da condução deste trabalho.

À Profa. Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo, por ter disponibilizado e me recebido no Laboratório de Ictiogenética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, durante o desenvolvimento dos primeiros protocolos de biologia molecular.

A Sheila Oliveira de Souza Silva, por ser uma pessoa incrível, prestativa, prática e sempre disposta a ajudar. Quero agradecer imensamente pelos seus ensinamentos técnicos e científicos em biologia molecular, pelas dicas importantes que fizeram minhas PCRs funcionarem e pela ajuda constante no desenvolvimento deste trabalho. Sem palavras para dizer o quanto sou grato a você.

A Sueli Akemi Taniwaki, também agradeço pela sua gentileza e disponibilidade constante em me ajudar, pelos seus ensinamentos fundamentais em bioinformática, por responder e atender aos meus milhares de questionamentos e por todo apoio dado durante o curso deste projeto. Também não tenho palavras que expressem a minha gratidão.

A Laila Bezerra, pelo tempo de bancada compartilhado, pelas dicas e suporte imediato nas minhas dúvidas de bioinformática, pelas boas risadas e por compartilhar do desespero de ver nossas PCRs não funcionarem... e da alegria de vê-las funcionando.

A todos os pós-graduandos do LABMAS: Iracema, Gisele, Nara, Luis, Aline, Ana Marcia, Patrícia, pelo auxílio e ajuda no laboratório, e as estagiárias Mari, Gabi e Izabel, pela ajuda durante a condução dos trabalhos no laboratório.

Ao Prof. Dr. Fábio Gregori, pelas dicas fundamentais nas análises dos eletroferogramas e bioinformática.

A Carla Rodenbusch, pelo apoio na pesquisa, por ter sido tão prestativa em fornecer amostras positivas de CFPHV e pelas conversas em nossos encontros esporádicos em seminários, congressos e eventos, mas que foram fundamentais para que eu continuasse desenvolvendo este projeto.

Aos meus amigos e amigas que permaneceram, perto ou longe, junto comigo nesta caminhada: Luis Barros, Silvia Godoy, Cátia Dejuste, Patrícia Marques, Marta Priolli, Gabriela Priolli, Viviane Abraham. Obrigado pelo apoio e por entender minhas ausências e variações de humor.

A toda equipe do Projeto TAMAR-ICMBio, pelo suporte e auxílio durante as coletas. Agradeço especialmente a Cecília Baptistotte e sua equipe de estagiários e funcionários, Eduardo Lima, Thereza Damasceno, Armando José Barsante Santos e Luís Felipe de Melo Batista por todo apoio dado em Vitória-ES, Almofala-CE e Fernando de Noronha-PE.

Ao técnico do LAPCOM, Jorge Oyakawa, meu muito obrigado pelo suporte constante em toda a parte logística envolvida na coleta e na compra de materiais.

À Mara Casarin, secretária do Programa de Pós-Graduação Interunidades ESALQ-CENA/USP, por sua disponibilidade em me atender sempre e com tanta gentileza.

À bibliotecária Silvia Maria Zinsly, da Biblioteca da ESALQ, por ter me atendido com tanta agilidade, pelas correções e organização desta tese.

Ao auxílio financeiro da CAPES e FAPESP.

No entanto, deveríamos olhar com mais frequência pelo balaústre do nosso navio, como passageiros curiosos, e não fazer a viagem como marinheiros obtusos desfiando estopa.

Henry David Thoreau

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVOS	21
1.1.1 Gerais.....	21
1.1.2 Específicos	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS DAS TARTARUGAS VERDES (<i>CHELONIA MYDAS</i>).....	23
2.2 BIOLOGIA E ETIOLOGIA DA FIBROPAPILOMATOSE	27
2.3 BIOLOGIA DOS HERPESVÍRUS E CARACTERIZAÇÃO DO CFPHV (<i>CHELONID FIBROPAPILLOMA-ASSOCIATED HERPESVIRUS</i>)	33
REFERÊNCIAS	35
3 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus</i> (CFPHV) EM SECREÇÕES DE <i>CHELONIA MYDAS</i> NA COSTA ATLÂNTICA BRASILEIRA	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT	42
3.1 INTRODUÇÃO	43
3.2 DESENVOLVIMENTO	45
3.2.1 Áreas de estudo e coleta de dados.....	45
3.2.2 Coleta de secreções.....	46
3.2.3 Extração de DNA.....	46
3.2.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	47
3.2.5 Leitura e análise dos produtos da PCR	49
3.2.6 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos	49
3.2.7 Análise das sequências	49
3.2.8 Análise filogenética	50
3.3 Resultados	50
3.3.1. Prevalência de CFPHV nas amostras e genes detectados.503.3.2 Caracterização molecular de CFPHV e sua relação com os haplótipos de mtDNA	52
3.4 Discussão	55
3.4.1 Prevalência, manutenção do vírus no ambiente aquático e ciclo lítico	55
3.4.2 Correlação entre as sequências de CFPHV e mtDNA de <i>Chelonia mydas</i>	57
3.5 Conclusões.....	58
Referências	59
4 EVIDÊNCIA DE NEUROTROPISMO E LATÊNCIA DE <i>Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus</i> (CFPHV) EM CÉREBRO DE <i>CHELONIA MYDAS</i>	63
RESUMO.....	63
ABSTRACT	63
4.1 INTRODUÇÃO	64
4.2 DESENVOLVIMENTO	66
4.2.1 Áreas de estudo e coleta de amostras.	66
4.2.2 Processamento das amostras.....	67
4.2.3 Extração de DNA.....	68
4.2.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	68
4.2.5 Leitura e análise dos produtos da PCR	69
4.2.6 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos.....	70
4.2.7 Análise das sequências	70
4.2.8 Análise filogenética	70

4.3 RESULTADOS.....	71
4.3.1. Dados biométricos, observações macroscópicas e necroscópicas	71
4.3.2 Caracterização molecular de CFPHV	74
4.4 DISCUSSÃO	76
4.4.1 Latência, coevolução e fibropapilomatose	76
4.4.2 Correlação entre as sequências de CFPHV, latência e dispersão viral	78
4.5 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	80
5 PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO <i>Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus</i> (CFPHV) EM TARTARUGAS VERDES COM E SEM FIBROPAPILOMATOSE NA COSTA BRASILEIRA	83
RESUMO	83
ABSTRACT	84
5.1 INTRODUÇÃO	85
5.2 DESENVOLVIMENTO	87
5.2.1 Áreas de estudo e coleta de dados.	87
5.2.2 Coleta de amostras de pele e tumor	88
5.2.3 Extração de DNA	88
5.2.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	89
5.2.5 Leitura e análise dos produtos da PCR.....	90
5.2.6 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos	91
5.2.7 Análise das sequências	91
5.2.8 Análise filogenética.....	91
5.3 RESULTADOS.....	92
5.3.1. Prevalência de CFPHV em animais com e sem fibropapilomatose.....	92
5.3.2 Caracterização molecular de CFPHV	94
5.4 DISCUSSÃO	96
5.4.1 Prevalência e Caracterização Molecular de CFPHV	96
5.5 CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS	104
6 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE US3 QUINASE EM CFPHV (<i>Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus</i>) NA COSTA BRASILEIRA	107
RESUMO	107
ABSTRACT	107
6.1 INTRODUÇÃO	108
6.2 DESENVOLVIMENTO	109
6.2.1 Áreas de estudo e coleta de dados.	109
6.2.2 Coleta de amostras de pele e tumor	110
6.2.3 Extração de DNA	111
6.2.4 Delineamento da reação em cadeia pela polimerase (PCR)	111
6.2.5 Leitura e análise dos produtos da PCR.....	112
6.2.6 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos	112
6.2.7 Análise das sequências	113
6.2.8 Análise filogenética.....	113
6.3 RESULTADOS.....	113
6.3.1 Determinação da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	113
6.3.2 Caracterização molecular de fragmento parcial do gene da serina/treonina quinase em CFPHV.	115
6.5 DISCUSSÃO	116
6.6 CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS	118
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	121

RESUMO

Ecologia, Prevalência e Caracterização molecular de *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) em tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) em áreas da costa brasileira

Os herpesvírus são normalmente adaptados a um único grupo de hospedeiros, e esta associação parasita-hospedeiro está ligada à sua seleção e coevolução. Estes agentes podem causar infecções latentes, onde normalmente o vírus não se replica. Durante o ciclo lítico, no entanto, outras células são infectadas e liberam partículas virais capazes de infectar outros indivíduos. O CFPHV (*Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus*) tem sido apontado como principal agente infeccioso ligado a fibropapilomatose em tartarugas-marinhas. A doença caracteriza-se por uma proliferação cutânea benigna mas que, dependendo da sua severidade, pode comprometer a sobrevivência do indivíduo afetado, sendo por isso apontada como importante ameaça a conservação de tartarugas-marinhas, particularmente de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*), a principal espécie acometida pela doença. Alguns aspectos da biologia do CFPHV e sua relação com as tartarugas verdes foram estudados no presente trabalho. Primeiramente, a capacidade deste agente em se disseminar pelo ambiente e infectar outros indivíduos, e as possíveis vias envolvidas nesta dispersão. Em seguida, avaliou-se os possíveis tecidos em que o herpesvírus pode estabelecer a infecção latente. Por fim, determinou-se a prevalência de indivíduos de *Chelonia mydas* infectados pelo CFPHV em duas áreas de alimentação (Ubatuba-SP e Vitória-ES) e em uma área mista - de alimentação e reprodução (Fernando de Noronha-PE). No primeiro estudo, observou-se que a prevalência de CFPHV nas amostras de secreções de *Chelonia mydas* variou entre 0%, no Espírito Santo, a 25%, em São Paulo. Os haplótipos afetados foram CMA-3 e CMA-8, e a variante viral encontrada não havia sido detectada anteriormente no Brasil, mas possui elevada similaridade com vírus provenientes do Golfo da Guiné e de Porto Rico. Os resultados sugerem que estes vírus podem ser transmitidos por secreções e também circular entre diferentes regiões. No segundo estudo, detectou-se a presença de CFPHV no cérebro de 5 animais necropsiados e também na pele e em lesões fibropapilomatosas. Em um dos animais foi detectada a presença de uma única variante de CFPHV no cérebro, pele e tumores. Esta variante ainda não havia sido detectada no Brasil e apresentou 100% de identidade com a variante detectada nas secreções. Para avaliar a relação entre haplótipos e variantes virais, o terceiro estudo determinou a prevalência de CFPHV em pele e tumores de 136 indivíduos – 9,56% de indivíduos sadios apresentavam o agente em tecido epitelial e 45,58% dos animais foram positivos para CFPHV, quando considerados também animais com fibropapilomatose. Duas novas variantes de herpesvírus foram encontradas: Var. 7, em Ubatuba-SP e Vitória-ES e Var. 8, em Vitória-ES. Não houve associação entre uma variante viral e um haplótipo. Os resultados observados permitem apontar que o CFPHV pode estabelecer infecções latentes; o vírus pode “migrar” entre diferentes regiões, junto com seus hospedeiros; partículas virais podem ser liberadas por secreções; duas novas variantes foram identificadas. Altas taxas de substituição de nucleotídeos em CFPHV podem indicar o surgimento das variantes destas áreas, mas a alta similaridade entre as variantes detectadas e àquelas de Porto Rico e Golfo da Guiné sugerem também a entrada de novas variantes na costa brasileira.

Palavras-chave: *Chelonia mydas*; CFPHV; Latência; Replicação viral; mtDNA; Fibropapilomatose

ABSTRACT

Ecology, prevalence and molecular characterization of *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) in *Chelonia mydas* of Brazilian coast areas

Herpesviruses are usually adapted to a single group of hosts, and this host-parasite association is linked to its selection and co-evolution. These agents can cause latent infections, where the virus usually does not replicate. During the lytic cycle, however, other cells are infected and release viral particles capable of infecting other individuals. The CFPHV (*Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus*) has been indicated as the main infectious agent linked to fibropapillomatosis on sea turtles. The disease is characterized by a benign skin proliferation, but, depending on its severity, can compromise the survival of the affected individual, therefore considered an important threat to the conservation of sea turtles, especially green turtles (*Chelonia mydas*), the main species affected by the disease. Some aspects of the CFPHV biology and its relation to green turtles were studied in this work. Firstly, the ability of this agent to spread in the environment and infect other individuals, and the possible pathways involved in this dispersion. Then, potential tissues wherein the herpesvirus can establish latent infection were assessed. Finally, we determined the prevalence of *Chelonia mydas* individuals infected by CFPHV in two feeding areas (Ubatuba-SP and Vitória-ES) and in a mixed area of feeding and reproduction (Fernando de Noronha-PE). In the first study, it was observed that the prevalence of CFPHV in samples of *Chelonia mydas* secretions ranged from 0% in Espírito Santo, to 25% in São Paulo. Affected haplotypes were CM-A3 and CM-A8, and viral variant found had not been previously detected in Brazil, but it is significantly similar to viruses found in the Gulf of Guinea and Puerto Rico. The results suggest that these viruses can be transmitted by secretions and can also circulate among different regions. Considering the low maintenance of the agent within the environment, they are probably brought by individuals with the latent virus, being capable of releasing viral particles during the herpesvirus replication cycle. In the second study, the presence of CFPHV was detected inside the brain of 5 necropsied animals, besides the detection of the virus on the skin and fibropapillomatosis lesions. In one of the animals, it was possible to characterize the CFPHV and the presence of a single viral variant inside the brain, tumors and on the skin of the same animal was detected. This variant had not yet been detected in Brazil and showed 100% identity with the variant detected in secretions. These results indicate that the virus may establish a latent infection in nerve tissue. To evaluate the relationship between haplotypes and viral variants, the third study determined the prevalence of CFPHV on skin and tumors of 136 individuals - 9.56% of healthy individuals showed the agent in epithelial tissue and 45.58% of the animals were positive for CFPHV, when also considered animals with fibropapillomatosis. Two new variants of the herpesvirus were found, Var. 7 in Ubatuba-SP and Vitória-ES and Var. 8 only in Vitória-ES. *C. mydas* individuals of different haplotypes were infected, and there was no association between a viral variant and a haplotype. The observed results permitted to point that CFPHV can establish latent infections in *Chelonia mydas*; the virus can "migrate" among different regions, along with its hosts; viral particles can be released by secretion; viral variants previously detected were not found in these areas, but two new variants were detected. The high nucleotide substitution rates observed in CFPHV may indicate the emergence of these variants in these areas, but the high similarity among the detected variants and those identified in Puerto Rico and Gulf of Guinea also suggest the entry of new variants into the Brazilian coast.

Keywords: *Chelonia mydas*; CFPHV; Latency; Viral replication; mtDNA; Fibropapillomatosis

1 INTRODUÇÃO

A compreensão dos processos ecológicos que regem as relações entre parasitas e hospedeiros é bastante complexa. Isto porque estas relações envolvem uma série de características específicas de cada um destes organismos.

Para o hospedeiro, uma série de mecanismos fisiológicos e imunológicos é desencadeada quando ocorre a infecção, com o objetivo de manter a condição de sanidade do hospedeiro. Ao mesmo tempo, o parasita acessa uma série de estratégias para infectar, estabelecer-se em seus tecidos ou órgãos-alvos e ainda conseguir se replicar e infectar outro hospedeiro.

A complexidade é acrescida das interações espaço-temporais entre estes dois organismos. Do ponto de vista temporal, a relação parasita-hospedeiro pode ter se originado há milhares de anos e pressionado que mudanças em nível molecular tenham sido selecionadas durante este longo período de relação. Estas mudanças podem ocorrer em diferentes taxas, algumas mais rápidas e outras mais lentas, considerando que, durante este processo dinâmico, ambas as espécies possam coexistir ao longo do tempo.

Do ponto de vista espacial, outra variável passa a fazer parte desta relação: o ambiente em que estes dois organismos estabeleceram e mantem seus vínculos. E, neste momento, a complexidade se torna ainda maior: o ambiente pode exercer novas pressões de seleção sobre um ou ambos os organismos envolvidos na relação parasita-hospedeiro e também afetar a sanidade do hospedeiro.

Se nesta relação parasita-hospedeiro-ambiente notar-se um desequilíbrio, instala-se, então, uma preocupação do ponto de vista de conservação, neste caso envolvendo principalmente a manutenção do hospedeiro ao longo do tempo e a melhoria das condições ambientais do habitat dos organismos infectados.

A relação entre o alfa herpesvírus associado a fibropapilomatose em tartarugas marinhas é um destes intrincados processos de interação parasita-hospedeiro. Tanto o vírus quanto os quelônios são bastante antigos e provavelmente estabeleceram a relação parasita-hospedeiro ao longo de milhares de anos.

Estes agentes são capazes de disseminar-se por saliva, secreções ou via contato sexual. Durante esta fase, chamada de ciclo lítico, o agente tende a infectar novos hospedeiros, mantendo-se na população do organismo infectado. No entanto, eles também podem

permanecer, por longos períodos, em sítios específicos do hospedeiro, mantendo uma infecção normalmente assintomática. Os sítios específicos mais conhecidos destes vírus são o tecido epitelial ou o sistema nervoso. Em alguns casos, no entanto, podem ocorrer infecções sintomáticas nestes tecidos, gerando o quadro de doença.

Apesar deste aspecto ser conhecido para alguns alfa herpesvírus, encontra-se pouco elucidado na literatura científica como isto ocorre com o CFPHV.

A prevalência de CFPHV em tartarugas marinhas é de 15%, estando presente tanto em tecido epitelial de animais sadios quanto em lesões conhecidas como fibropapilomas. Particularmente em *Chelonia mydas*, esta prevalência chega a aproximadamente 30%.

Considerando que o CFPHV está presente nas lesões fibropapilomatosas, o agente tem sido apontado como causa primária da fibropapilomatose. Esta doença caracteriza-se por uma proliferação tumoral benigna do tecido epitelial, que resulta em lesões de aspecto liso ou verrucoso que podem atingir grandes dimensões e prejudicar o indivíduo acometido pela doença, por interferir na natação, na visibilidade ou no acesso a alimentos.

A literatura científica aponta que a infecção de *Chelonia mydas* pelo CFPHV ocorre nas áreas de alimentação. E, desta forma, compreender a biologia do hospedeiro passa a ser importante para elucidar a relação parasita-hospedeiro.

As tartarugas verdes possuem uma biologia populacional bastante complexa. A espécie é circuntropical e apresenta comportamento migratório e filopátrico. A filopatria é caracterizada pelo retorno das fêmeas em idade reprodutiva às praias onde nasceram, realizando a postura na mesma região que sua progenitora. Devido a esta característica comportamental, é possível identificar a origem reprodutiva dos animais que compõem as metapopulações nas áreas de alimentação, a partir da análise do DNA mitocondrial.

O DNA mitocondrial é haplóide e tem origem materna. A análise de determinado gene e a avaliação das divergências entre sequências deste gene no mtDNA permite relacionar sequências específicas a uma área de reprodução. Uma sequência específica caracteriza um haplótipo e, portanto, sua origem reprodutiva. E assim, ao estudar as áreas de alimentação, é possível entender a composição dos estoques mistos ao longo do tempo.

Ao relacionar a biologia do herpesvírus com os aspectos comportamentais das tartarugas verdes (*Chelonia mydas*), surge uma série de questionamentos sobre a relação parasita-hospedeiro.

O primeiro destes questionamentos está ligado a infecção pelo herpesvírus: se o vírus infecta o hospedeiro nas áreas de alimentação, devem haver vetores que disseminam o agente ou o próprio animal infectado libera o vírus no ambiente. Se o animal libera o agente, quais são os mecanismos envolvidos na disseminação deste agente e como ocorre a infecção de outro indivíduo?

Outro questionamento também está ligado a biologia do agente e ao comportamento migratório das tartarugas marinhas: Se o animal é infectado, e o herpesvírus é capaz de estabelecer uma infecção latente, é possível que o vírus também migre até as áreas de reprodução. É possível que o vírus permaneça latente até o retorno do indivíduo adulto às áreas de reprodução ou ele pode ser transmitido verticalmente? E, se o vírus estabelece esta infecção latente, onde ele permanece até o momento de ocorrer a replicação viral?

Este trabalho foi proposto com o objetivo de compreender alguns destes questionamentos e também buscar correlações entre os haplótipos de *Chelonia mydas* e as diferentes variantes virais detectadas na costa brasileira.

1.1 Objetivos

1.1.1 Gerais

- Determinar a prevalência de CFPHV em *Chelonia mydas* do litoral brasileiro, a partir da detecção do agente em tecido epitelial, tumores, tecido nervoso e secreções;
- Caracterizar as variantes de herpesvírus existentes na costa brasileira, a partir da análise de sequências da DNA polimerase;
- Avaliar quais haplótipos de *Chelonia mydas* do litoral brasileiro são infectados pelo CFPHV, e analisar sequências da DNA polimerase viral associadas a estes haplótipos.

1.1.2 Específicos

- Propor um mecanismo de disseminação e via de contágio para o CFPHV a partir da análise da prevalência do vírus nas secreções oral e ocular;
- Sugerir possíveis órgãos-alvo em que o CFPHV mantém a infecção latente;
- Analisar a variabilidade das sequências da DNA polimerase de CFPHV, identificando se estas sequências são semelhantes às identificadas em estudos anteriores no Brasil;

- Determinar quais os haplótipos de *Chelonia mydas* em que houve uma maior prevalência do CFPHV;
- Determinar se sequências específicas do CFPHV estão associadas a um haplótipo de tartaruga-verde;
- Propor novos genes para detecção de CFPHV em *Chelonia mydas*;
- Sugerir modelos para a infecção por alfa herpesvírus em tartaruga-verde.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos biológicos e ecológicos das tartarugas verdes (*Chelonia mydas*).

As tartarugas marinhas são répteis pertencentes a ordem Testudines, e caracterizam-se por uma estrutura corpórea formada por uma carapaça de formato hidrodinâmico, resultado da fusão dos ossos das vértebras e costelas. Este caráter é extremamente conservado, sendo apresentado por todos os animais pertencentes a esta ordem, e sofreu pouquíssimas alterações em 300 milhões de anos (ERNEST, BARBOUR, 1989; LUTCAVAGE, 1997; LUTZ, 1997; WYNEKEN, 2001).

Todas as sete espécies de tartarugas marinhas tem sofrido reduções drásticas nas últimas décadas, e encontram-se listadas como ameaçadas ou em perigo de risco de extinção pela IUCN – União Internacional para Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (MEYLAN; MEYLAN, 1999; IUCN, 2012), particularmente devido à predação direta para consumo de carne e ovos, uso da carapaça para fabricação de artefatos e pesca acidental (CAMPBELL, 2003). As populações também estão sujeitas a poluição ambiental e a fibropapilomatose, doença associada a um alfaherpesvírus cujo impacto na população ainda é pouco conhecido.

Chelonia mydas foi descrita inicialmente por Linnaeus, em 1758, como *Testudo mydas* e, posteriormente recebeu seu nome atual de Schweigger, em 1812 (FORMIA, 2002). A espécie caracteriza-se pela carapaça óssea revestida de escudos córneos justapostos e nadadeiras anteriores dotadas de unha bastante evidente. A cabeça apresenta formato arredondado e a mandíbula encontra-se revestida por estrutura córnea e serrilhada chamada ramfoteca (WYNEKEN, 2001). A coloração varia em tons de verde, oliva e marrom, com manchas ou padrões rajados e estriados que podem se alterar durante o desenvolvimento do animal (FORMIA, 2002). São denominadas popularmente de tartaruga-verde, em função da tonalidade esverdeada de sua gordura, e apresentam plastrão branco ou amarelo claro e pele cinza ou marrom, com halo mais claro margeando as escamas e tom amarelo claro na porção ventral da nadadeira (WYNEKEN, 2001).

As características utilizadas na identificação desta espécie são a presença de quatro pares de escudos laterais na carapaça, em que o primeiro par nunca encontra a placa nugal, dois pares de escamas pré-frontais e quatro pares de escamas pós-orbitais na cabeça (PRITCHARD, MORTIMER, 2000, Figura 2.1).

Figura 2.1 - *Chelonia mydas*. Prancha de Identificação (PRITCHARD, MORTIMER, 2000)

A *Chelonia mydas* é encontrada em mares tropicais e subtropicais, tendo distribuição circunglobal, apresentando hábito herbívoro durante a maior parte da sua vida. Um dos aspectos biológicos mais importantes nesta espécie refere-se a seu comportamento migratório. As migrações de tartarugas verdes são realizadas por centenas ou milhares de quilômetros (LUTZ, 1997; PLOTKIN, 2003). Este comportamento ocorre a partir da eclosão dos ovos. Os recém-eclodidos realizam uma deriva passiva, sendo levados pelas correntes marítimas, e a fase pelágica inicial, chamada de “anos perdidos”, pode ocorrer em mantos de *Sargassum* que se formam próximos às principais correntes (MEYLAN; MEYLAN, 1999). Os filhotes permanecem nesta fase até atingirem um comprimento retilíneo de carapaça entre 20 a 30 cm, dirigindo-se então para a costa litorânea de diversas áreas do globo, onde permanecerão por um período longo. Estes locais são denominados de áreas de alimentação e constituem os “habitats de desenvolvimento” da espécie, que permanece associada a bancos de algas, utilizados para sua alimentação (MORTIMER, 1982; SPOTILA, 2004). Os indivíduos juvenis podem permanecer em uma mesma área de alimentação ou se deslocar entre elas, e mantem-se nestas áreas pela maior parte do seu ciclo de vida, onde se desenvolvem até atingirem a maturidade sexual (BALAZS, 1980; GULKO; ECKERT, 2004), que ocorre normalmente entre 25 e 50 anos de idade (CHALOUPKA et al., 2004).

Após este longo período nas áreas de forrageio e alimentação, os indivíduos adultos migram por longas distâncias e, particularmente nas fêmeas, esta migração ocorre na direção ao local onde nasceram, comportamento este conhecido como *natal homing* ou filopatria (CARR, 1967; CARR et al., 1978). A partir da década de 1990, o comportamento filopátrico passou a ser comprovado pela utilização de ferramentas de genética e biologia molecular. Bowen et al., 1992, utilizando como marcador molecular sequências da região controle do DNA mitocondrial, puderam determinar a assinatura genética clara entre diferentes áreas de reprodução, determinando assim os haplótipos de tartarugas-marinhas. A escolha do DNA mitocondrial foi feita baseada no fato desta informação genética ser haploide, citoplasmática e transmitida maternalmente, e apresentar taxa de evolução rápida, permitindo detectar mutações particulares acumuladas e, desta forma, serem utilizadas em estudos microevolutivos e de história matrilinear (AVISE, 2009)

Inúmeros trabalhos foram realizados a partir de Bowen et al., 1992, evidenciando não somente a filopatria de *Chelonia mydas* e de outras espécies de tartarugas-marinhas, mas também a composição heterogênea das áreas de alimentação, onde se observa a presença de diversos haplótipos constituindo os estoques mistos destas áreas (LAHANAS et al., 1994; ENCALADA et al., 1996; NARO-MACIEL et al, 2007, 2012; JENSEN, FITZSIMMONS, DUTTON, 2013).

Durante o processo de reprodução e ovoposição, somente as fêmeas visitam as praias, fazendo de 3 a 7 posturas na época de reprodução, depositando cerca de 130 ovos por postura. O retorno aos sítios de desova ocorre em ciclos com intervalos de 2 a 4 anos, e a desova inicia-se em novembro, com pico entre janeiro e fevereiro e final da desova entre março e abril.

No Brasil, as principais áreas de desova são a Praia do Forte e as Ilhas Oceânicas como Trindade-ES, Atol das Rocas-RN e Arquipélago de Fernando de Noronha-PE. As ilhas de Ascensão, na linha do Equador, e áreas na Costa Rica, Suriname, Venezuela e África são as principais áreas de desova da espécie no Atlântico Sul.

As possíveis rotas migratórias de *C. mydas* tem se revelado bastante complexas. A migração para a Ilha de Ascensão, por exemplo, envolve deslocamentos de aproximadamente 2.000 km, sendo reconhecido como uma das mais espetaculares migrações marinhas (PAPI, LUSCHI, 1996; LUSCHI et al., 1998).

NARO-MACIEL et al., 2007, 2012, a partir do mtDNA de *C. mydas*, determinaram a composição de haplótipos presentes em áreas de alimentação na costa brasileira e associaram

às áreas de reprodução do Atlântico Sul, demonstrando a ampla participação das áreas de reprodução também do Atlântico Sul na composição dos estoques mistos das áreas de alimentação. Foi possível verificar, a partir destes trabalhos, que animais provenientes das áreas de reprodução de Trindade, Ascensão, Atol das Rocas, Suriname, Costa Rica, Ilha de Aves, na Venezuela, México, Chipre, Guiné Bissau, Ilhas de Bioko, na Guiné Equatorial e São Tomé, no Golfo da Guiné são os principais responsáveis pela constituição dos estoques mistos das áreas de alimentação da costa brasileira.

Jordão, 2013, a partir de um amplo estudo na costa brasileira, demonstrou a significativa participação do haplótipo CM-A8 no litoral brasileiro, seguidos pelo haplótipo CM-A5 e com menor presença dos haplótipos CM-A1, CM-A3, CM-A6 e CM-A9. O haplótipo mais comum, CM-A8, provém de colônias localizadas na Ilha Ascensão, Guiné Bissau e Brasil, no Atlântico Sul. CM-A3 e CM-A5 são oriundos do Atlântico Norte, enquanto os haplótipos CM-A6 e CM-A9 também se referem a áreas de reprodução do Atlântico Sul.

No Brasil, as principais áreas de reprodução e alimentação de tartarugas verdes e outras espécies de tartarugas marinhas são monitoradas pelo Projeto TAMAR/ICMBio e vão desde o litoral de Santa Catarina, na região Sul, ao Ceará, na região Nordeste (Figura 2.2)

Figura 2.2 – Áreas de alimentação e reprodução monitoradas pelo Projeto TAMAR/ICMBio. Fonte: www.tamar.org.br (2015)

A compreensão da composição dos estoques de *C. mydas* nas áreas de alimentação fornece um importante subsídio para elucidar como os impactos negativos nestas áreas podem influenciar a recomposição da estrutura das áreas de reprodução.

2.2 Biologia e Etiologia da Fibropapilomatose

A fibropapilomatose cutânea – GTFP (Green turtle fibropapillomatosis), foi relatada pela primeira vez em 1936, no aquário de Nova Iorque, em um indivíduo de *Chelonia mydas* trazido da Flórida dois anos antes de manifestar os tumores (SMITH, COATES, 1938). Inúmeros relatos se sucederam após a primeira descrição das lesões: em diferentes pontos na Flórida, em

1938, e na Indonésia, Malásia e Havaí, em 1958. A ocorrência de tumores na costa oriental dos Estados Unidos aumentou de 10%, em 1980, para acima de 30% em 1990 (BALAZS, 1991; HERBST, 1994; FOLEY et al, 2005) e a prevalência passou a aumentar em várias regiões nos Estados Unidos: variou de 0 a 72,5% na Flórida, entre 1975 e 1981 (EHRHART, 1991) e de zero a 92% no Havaí (BALAZS, POOLEY, 1991).

As maiores prevalências da doença são encontradas em *Chelonia mydas*, mas há registro da doença em *Caretta caretta*, *Lepidochelys olivacea*, *Lepidochelys kempi*, *Eretmochelys imbicata* e *Dermochelys coriacea* (HERBST, 1994; AGUIRRE et al, 1999). No Brasil, o primeiro registro de fibropapilomatose data de 1986, no Espírito Santo, em *Chelonia mydas* (BAPTISTOTTE, 2007). No Brasil, um estudo do período de 2000 a 2004 revelou a prevalência de 14,86% de tumores em 4.471 indivíduos de tartarugas verdes (BAPTISTOTTE, 2007)

De ocorrência circuntropical, a fibropapilomatose tem sido observada em todos os grandes oceanos. Os estágios de vida afetados são juvenis, subadultos e adultos, não existindo registros em filhotes e pós-filhotes (HERBST, 1994).

A etiologia da doença tem sido relacionada a um herpesvírus. A partir da análise de uma sequência de 23.055 pares de bases do genoma de herpesvírus associado à fibropapilomatose, GREENBLATT et al., 2005 identificaram que o vírus pertence ao gênero *Alphaherpesvirinae*. A fibropapilomatose foi induzida experimentalmente em cativeiro a partir da inoculação de homogeneizados de células de tumores e técnicas de amplificação gênica por reação em cadeia (PCR) tem demonstrado a presença de alfa herpesvírus consistentemente associados aos tecidos tumorais (JACOBSON et al., 1991; HERBST et al., 1995, LACKOVICH et al., 1999; QUACKENBUSH et al., 2001, WORK et al., 2005). ENE et al., 2005, apontaram 100% de associação de alfa herpesvírus e tumores induzidos por inoculação de filtrados de células tumorais enquanto QUACKENBUSCH et al., 2001, detectaram a presença do vírus em 95% das infecções naturais. WORK et al., 2009, demonstraram associação entre este alfa herpesvírus e fibroblastos e queratinócitos, em estudos *in vitro*, e apontaram a dificuldade de cultivo do vírus em condições laboratoriais.

Os fibropapilomas cutâneos caracterizam-se por massas tumorais simples ou múltiplas que variam entre 0,1 e 30 cm de diâmetro, de aspecto verrucoso ou liso (Figura 2.3), sésseis ou pedunculados, sendo encontrados principalmente em nadadeiras, pescoço, cabeça, região inguinal e axilar e base da cauda (HERBST, 1994), demonstrada na figura 2.4. O tamanho e a quantidade de lesões observadas podem comprometer a habilidade do animal em se alimentar

e nadar, além de comprometer suas condições fisiológicas, gerando casos crônicos de estresse e imunodepressão (AGUIRRE, 1998; WORK, BALAZS, 1999). Animais acometidos podem apresentar anemia severa, hipoproteinemia, leucopenia e heterofilia, além de baixos valores de colesterol e triglicérides (NORTON, 1990; AGUIRRE et al., 1995; AGUIRRE, BALAZS, 2000; WORK et al., 2001, WORK et al., 2003). Grandes massas cutâneas ulceradas e necróticas (Figura 2.4) servem como porta de entrada para outros patógenos, podendo contribuir para a ampliação de quadros de mortalidade nestas áreas (HERBST, 1994).

No entanto, a manifestação da doença é multifatorial e pode estar associada a alguns aspectos ambientais: insolação, áreas de maior produtividade primária, presença de compostos de nitrogênio na água, presença de contaminantes químicos imunossupressores, como os PCBs, entre outros.

Figura 2.3 - Aspecto verrucoso de fibropapiloma presente em indivíduo estudado em Ubatuba – SP. FONTE: PRIOSTE (2014).

Figura 2.4 - Indivíduo juvenil de *C. mydas* acometido por fibropapilomatose, com fibropapilomas múltiplos nas nadadeiras anteriores e pescoço. Fonte: PRIOSTE (2014).

Estudos apontam que o uso do solo pode estar associado à maior prevalência de fibropapilomatose. No Havaí, mapas de uso do solo foram elaborados e associados à prevalência da doença, demonstrando que elevadas concentrações de nitrogênio, processos de eutrofização e presença de algas invasoras apresentaram relação com a maior frequência de animais com lesões cutâneas fibropapilomatosas (VAN HOUTAN et al., 2010).

ARTHUR et al., 2008, apontou correlação positiva entre a ingestão de *Lyngbia majuscula*, cianobactéria capaz de produzir substâncias promotoras de tumor, e a presença de lesões fibropapilomatosas.

O diagnóstico da doença pode ser realizado por observação dos tumores, que devem ser posteriormente confirmados por avaliação histopatológica, caracterizada por projeção papilar e marcante hiperplasia da epiderme, proliferação de fibroblastos em vários estágios de diferenciação e presença de feixes de fibra de colágeno na derme (MATUSHIMA et al., 2003; GREENBLATT et al., 2005).

Testes para detecção de infecções sub-clínicas ou latentes não foram desenvolvidos, sendo um dos aspectos mais relevantes da compreensão da resposta imunológica à presença do herpesvírus (HERBST et al., 1995). Em HERBST et al., 1998, o uso de anticorpos de indivíduos inoculados experimentalmente permitiu a confirmação para alfa herpesvírus em animais positivos para as lesões fibropapilomatosas, mas não para animais que não apresentavam a

lesão. A metodologia baseia-se no uso de material histológico previamente confirmado como GTFP positivo e incubação deste material com plasma de animais a serem confirmados. Amostras de soro de animais positivos e negativos para GTFP a partir de lesões foram coletados no Brasil e encaminhados para sorologia no Instituto Biológico-SP, mas ambos foram negativos para alfa herpesvírus de suínos (dados preliminares, não publicados). A inespecificidade da reação imunológica demonstra a necessidade da aplicação de métodos sorológicos específicos para a detecção da resposta imune ao alfa herpesvírus de fibropapilomas de tartarugas marinhas.

Além das lesões externas, nódulos viscerais também são encontrados, primariamente em pulmões, rins e coração, mas também em trato gastrointestinal e fígado (AGUIRRE et al., 2001, NORTON et al., 1990, WORK, BALAZS, 1998).

Encontra-se também pouco elucidado na literatura os mecanismos de infecção pelo alfa herpesvírus, a virulência deste agente e suas variantes e o estágio de vida e as taxas de mortalidade de *C. mydas* decorrentes do fibropapiloma.

BAPTISTOTTE, 2007, analisando a base de dados do Projeto TAMAR entre 2000 e 2006, observaram a ausência de fibropapilomas em indivíduos de até 30 cm de comprimento, com elevada prevalência até o estágio sub-adulto (indivíduos com CCC entre 30 e 80 cm) e diminuição em indivíduos maiores (CCC > 80 cm). A ausência de lesões fibropapilomatosas em indivíduos menores que 30 cm coincide com o estágio de vida em que os indivíduos apresentam entre 2 a 5 anos e quando migram dos ambientes de alimentação oceânico para águas costeiras (BOLTEN, 2006). Neste trabalho, foram observadas diferentes prevalências de fibropapiloma nas populações de *C. mydas* ao longo da costa brasileira (Tabela 2.1).

Tabela 2.1- Frequência de tumores nos diferentes Estados do Brasil, entre 2000 e 2005. BAPTISTOTTE (2007).

Estado	Frequência de tumores	Intervalo de confiança 95.0%
Bahia	15,81% (211/1335)	[13,89%;17,87%]
Ceará	36,94% (181/490)	[36,65;41,38]
Espírito Santo	27,43% (469/1710)	[25,32;29,61]
Pernambuco(FN)	0,00% (0/501)	[0,00%;0,60%]
Rio de Janeiro	5,96% (9/151)	[2,76%;11,01%]
Rio Grande do Norte	31,43% (33/105)	[22,72%;41,22%]
Rio Grande do Norte (AR)	0,00% (0/486)	[0,00%;0,61%]
Santa Catarina	3,45% (2/58)	[0,42%;11,91%]
Sergipe	18,46% (12/65)	[9,92%;30,03%]
São Paulo	10,73% (371/3456)	[9,72%;11,81%]
Total	15,41% (1.288/8.359)	[14,64%;16,20%]

As mudanças de habitat e de dieta podem estar ligadas ao aumento da prevalência da doença. Algumas hipóteses e co-fatores que podem explicar este aumento são a concentração de poluentes nas áreas costeiras, maior probabilidade de exposição ao agente e a própria mudança de hábito alimentar. A elevada prevalência em indivíduos entre 30 e 80 cm foi observada na Indonésia, Havaí, Austrália, Flórida e Brasil (ADNYANA et al, 1997; MURAKAWA et al, 2000; LIMPUS, MILLER, 1990, FOLEY et al, 2005; BAPTISTOTTE, 2007). A redução da prevalência em indivíduos maiores (acima de 80 cm) podem estar ligados à idade e relacionados a características da doença (pode ser auto-limitante, em função do aumento da resistência imunológica em indivíduos mais velhos), a uma maior mortalidade de tartarugas verdes acometidas pela lesão ou a um conjunto dos dois fatores (FOLEY et al., 2005; BAPTISTOTTE, 2007). Recentemente tem sido apontado que fatores ligados a capacidade de invasividade e infecção do alfaherpesvírus podem também estar ligados a prevalência e curso clínico da fibropapilomatose (ALFARO-NUÑEZ et al., 2014)

Como a frequência de animais acometidos pela doença é maior em juvenis e subadultos, há uma forte preocupação com a conservação da espécie e a relação entre o vírus, sua forma de transmissão, as taxas de mortalidade em decorrência da fibropapilomatose e a reposição das populações ao longo do tempo. Como nestas fases de vida os indivíduos encontram-se nas áreas de alimentação, sujeitas a uma série de fatores que podem predispor o animal a manifestação da doença, torna-se importante associar a presença do alfaherpesvírus com a doença. Alguns trabalhos também apontam que o vírus pode estar presente tanto nos tumores quanto na pele de indivíduos sadios (ALFARO-NUÑEZ et al., 2014).

Trabalhos recentes tem ampliado o conhecimento sobre as sequências de DNA do alfaherpesvírus. A análise da sequência de fragmentos do gene da DNA polimerase do vírus tem se mostrado como uma importante ferramenta para determinação de variantes do alfaherpesvírus. A partir da comparação de 6.801 pb do genoma viral de alfaherpesvírus isolado de fibropapilomas, HERBST et al., 2004, identificaram cinco variantes. GREENBLATT et al., 2005, descreveram quatro grupos de variantes, a partir da análise da glicoproteína B, separados a partir da origem em variantes do Atlântico e do Pacífico.

A identificação de variantes do alfaherpesvírus vem sendo recentemente descritas. ENE et al., 2005, detectaram variantes deste herpes na costa da Flórida-EUA, Rodenbusch et al., 2014, caracterizaram seis variantes presentes em tumores na costa brasileira e ALFARO-NUÑEZ et al., 2014, detectaram diferenças em alfaherpesvírus de uma ampla área do globo terrestre.

2.3 Biologia dos Herpesvírus e caracterização do CFPHV (*Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus*)

De acordo com o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses* – Comitê Internacional de Taxonomia Viral), os herpesvírus pertencem a Ordem Herpesvirales, Família Herpesviridae, constituída por três subfamílias: Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae e Gammaherpesvirinae (ICTV, 2015). Os herpesvírus que infectam as tartarugas marinhas pertencem a Subfamília Alphaherpesvirinae, Gênero Scutavírus, Espécie *Chelonid herpesvirus* 5 (ICTV, 2015).

Os herpesvírus mais conhecidos infectam mamíferos e aves, mas há uma vasta literatura apontando a presença deste agente em répteis, anfíbios e peixes, além da família Malacoherpesviridae, responsável por infecções do sistema gânglio-nervoso em ostras. Estes vírus são constituídos por uma dupla fita de DNA linear, um capsídeo de simetria icosaédrica e um envelope lipídico que apresenta projeções em sua superfície. Os vírions são envelopados e possuem tamanho entre 100-300 nm, sendo sua estrutura facilmente identificada por microscopia eletrônica.

Em geral, os herpesvírus encontram-se adaptados a um único hospedeiro na natureza, sendo capazes de estabelecer infecções latentes que podem persistir a vida toda e mantidas em tecido nervoso, normalmente neurônios, e infecção lítica geralmente ocorre em células epiteliais (STRAUSS; STRAUSS, 2006).

A latência é estabelecida em um conjunto específico de células que são normalmente não-permissivas ou semi-permissivas ao crescimento viral, enquanto um conjunto diferente de células é infectado durante a replicação do vírus no hospedeiro, tornando-o capaz de liberar partículas virais capazes de infectar outros hospedeiros. Esta segunda fase é conhecida por ciclo lítico ou de replicação, e normalmente é fatal para as células infectadas (STRAUSS; STRAUSS, 2006; NATHANSON, 2007).

Ao serem liberados, os vírions são capazes de infectar outras células, através de ligações específicas entre moléculas do parasita (glicoproteínas, glicolípídeos ou glicosaminas) em um ou vários receptores das células susceptíveis do hospedeiro (NATHANSON, 2007). Após a ligação, ocorre a fusão da membrana viral com as membranas da célula infectada e o nucleocapsídeo formado é transportado pelos poros nucleares e chega ao núcleo, onde ocorre a replicação do DNA viral. A infecção latente é bastante conhecida em HSV (*Herpes Simplex*

Virus), e caracteriza-se pelo transporte dos nucleocapsídeos virais do axônio até os gânglios sensoriais, onde formam epissomos circulares e tornam-se residentes. Para HSV, o mecanismo de latência está vinculado a transcrição de LAT (*latency-associated transcript*), que mantém a infecção latente até que ocorra a reativação do agente (STRAUSS; STRAUSS, 2006).

A latência pode ser quebrada por uma série de fatores, como exposição à radiação UV, estresse ou alterações hormonais. Ao ser quebrada a latência, o vírus migra até o axônio que serve a um conjunto de células epiteliais, e nestas células, permissivas, inicia-se o ciclo lítico (STRAUSS; STRAUSS, 2006; NATHANSON, 2007).

O CFPHV (*Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus*), relacionado a outros alfaherpesvírus, apresenta forte coevolução com seu hospedeiro. Desta maneira, pode-se inferir que o ciclo biológico de infecção, latência e replicação também possa ser observado neste agente. Este vírus parece ter surgido antes da separação de alfaherpesvírus de aves e mamíferos, sugerindo que sejam exclusivos de tartarugas desde que estes organismos divergiram há cerca de 300 milhões de anos (JANKE et al., 2001; HERBST et al., 2004; McGEOCH; GATHERER, 2005).

Patrício et al., 2012 detectaram, a partir da análise de diversos genes de CFPHV, quatro linhagens geográficas de CFPHV: do Pacífico Leste, consistente com sequências provenientes de San Diego, Costa Rica e México; do Atlântico-Oeste/Leste do Caribe, relacionadas com CFPHV da Flórida e de Barbados; do Atlântico, consistente com sequências do Golfo da Guiné e de Porto Rico e do meio-oeste do Pacífico, caracterizada por amostras do Hawaí e da Austrália. Além dos aspectos evolutivos, trabalhos recentes tem buscado compreender a biologia de CFPHV, particularmente os aspectos relacionados aos mecanismos de infecção e latência deste agente. Page-Karjian et al, 2012 e Alfaro-Núñez et al., 2014 detectaram a presença deste herpesvírus em tecidos de animais saudáveis, uma evidência que reforça o mecanismo de latência. Alfaro-Núñez et al., 2014 recentemente estudaram a estrutura de proteínas do capsídeo de CFPHV, com o objetivo de determinar se variações nestas estruturas podem estar ligadas ao mecanismo de infecção do agente.

Também Ackermann et al., 2012, sequenciaram o genoma completo de CFPHV, sendo possível detectar uma série de genes atípicos e sequências conservadas em alfaherpesvírus. Este trabalho tem permitido detectar sequências no genoma do vírus que permitam comparações entre CFPHV de diferentes áreas do planeta, contribuindo para compreender a biologia do vírus e seus mecanismos de infecção, latência e replicação.

Referências

- ACKERMANN, M.; KORIABINE, M.; HARTMANN-FRITSCH, F.; JONG, P.J.; LEWIS, T.D.; SCHETLE, N.; WORK, T.M.; DAGENAIS, J.; BALAZS, G.H.; LEONG, J. C. The Genome of Chelonid Herpesvirus 5 Harbors Atypical Genes. **PLoS One**, São Francisco, v.7, n.10, p. 1-15, 2012
- ADNYANA, W.; LADDS, P.W.; BLAIR, D. Observations of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*) in Indonesia. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 75, n. 10, p. 737-742, 1997
- AGUIRRE, A.A.; BALAZS, G.H.;SPRAKER, T.R.; GROSS, T.S. 1995. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. **Physiological Zoological**, Chicago, v. 68, p. 831-854, 1995.
- AGUIRRE, A.A.; LIMPUS, C.L.;SPRAKER, T.R.;BALAZS, G.H. Survey of fibropapillomatosis and other potential diseases in marine turtles from Moreton Bay, Queensland, Australia. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON THE SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 19, 1999. South Padre Island. **Proceedings...** South Padre Island: NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-443, 1999. p. 36.
- AGUIRRE, A.A. Fibropapillomas in Marine Turtles: A Workshop at the 18th Annual Symposium on biology and conservation of sea turtles. **Marine Turtle Newsletter**, Exeter, v. 82, p. 10-12, 1998.
- AGUIRRE, A.A.; BALAZS, G.H. Blood biochemistry values of Green turtles, *Chelonia mydas*, with and without fibropapillomatosis. **Comparative Haematology International**, London, v. 10, p. 132-137, 2000.
- ALLARD, M.; MIYAMOTO, M.M.; BJOURNDAL, K.A.; BOLTEN, A.B.; BOWEN, B.W. Support for natal homing in green turtles form mitochondrial DNA sequences. **Copeia**, Washington, v. 94, p. 43-41, 1994.
- AVISE, J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 36, p.3-15, 2009.
- BALAZS, G.H. **Synopsis of biological data on the green turtle in the Hawaiian Islands**. Honolulu: U.S. Department of Commerce - NOAA Technical Memorandum NMFS SWFC,7, 1980. 141p.
- BALAZS, G.H. Current status of fibropapillomas in the Hawaiian green turtle, *Chelonia mydas*. In: BALAZS, G.H.; POOLEY, S.G. (Ed.) **Research plan form marine turtle fibropapilloma**. U.S.: U.S. Department of Commerce, National Oceanographic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service. 1991. p. 47-57.
- BAPTISTOTTE, C. **Caracterização espacial e temporal da fibropapilomatose em tartarugas marinhas da costa brasileira**. 2007. 63p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BJORNDAL, K.A.; BOLTEN, A.B.; MOREIRA, L.; BELLINI, C.; MARCOVALDI, M.A. Population structure and diversity of Brazilian Green turtle rookeries based on mitochondrial DNA sequences. **Chelonian Conservation and Biology**, Lunenburg, v. 5, n. 2, p. 262-268, 2006.

- BOLTEN, A.B.; BALAZS, G.H. Biology of the early pelagic stage – the “lost year”. In: **Biology and conservation of sea turtles**, revised edition. Washington, D.C: Smithsonian Institution Press, 1995. 620 p.
- BOWEN, B.W.; MEYLAN, A.B.; ROSS, P.; LIMPUS, C.J.; BALAZS, G.H.; AVISE, J.C. Global population structure and natural history of green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. **Evolution**, Lancaster, v. 46, p. 865-881, 1992.
- CAMPBELL, L.M. Contemporary culture, use and conservation of sea turtles. In: LUTZ, P.L., MUSICK, J.A., WYNEKEN, J. (Ed.). **The Biology of Sea Turtles**. Boca Raton: CRC Press, 2003. v.2. 432p.
- CHALOUPKA, M.; LIMPUS, C.; MILLER, J. Green turtle somatic growth dynamics in a spatially disjunct Great Barrier Reef metapopulation. **Coral Reefs**, Berlin, v. 23, p. 325-335, 2004.
- EHRHART, L.M. Fibropapillomas in green turtles of the Indian River Lagoon, Florida: distribution over time and area. In: BALAZS, G.H.; POOLEY, S.G. (Ed.). **Research plan for marine turtle fibropapilloma**. Honolulu: U.S. Department of Commerce – NOAA Technical Memorandum-NMFS-SWFSC – 156, 1991. p. 59-61.
- ENCALADA, S.E.; LAHANAS, P.N.; BJORNDALE, K.A.; BOLTEN, A.B.; MIYAMOTO, M.M.; BOWEN, B.W. 1996. Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, p. 473-483, 1995.
- ENE, A.; SU, M.; LEMAIRE, S.; ROSE, C.; SCHAFF, S.; MORETTI, R.; LENZ, J.; HERBST, L.H. Distribution of chelonid fibropapillomatosis-associated herpesvirus variants in Florida: Molecular genetic evidence for infection of turtles following recruitment to neritic developmental habitats. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 41, n. 3, p. 489-497, 2005.
- ERNEST, C.H.; BARBOUR, R.W. **Turtles of the World**. Washington, D. C. Smithsonian Institution Press, 1989. 313p.
- FOLEY, A.M.; SCHROEDER, B.A.; REDLOW, A.E.; FICK-CHILD, L, TEAS, W.G. 2005. Fibropapillomatosis in stranded green turtles *Chelonia mydas* from the eastern United States (1980-1998): trends and association with environmental factors. **Journal of Wildlife Disease**, Ames, v. 41, n.1, p.29-41, 2005.
- FORMIA, 2002. **Population and genetic structure of the green turtle (*Chelonia mydas*) in west and central Africa: implications for management and conservation**. 2002. 270 p. Thesis for Doctor of Philosophy - Cardiff University, 2002.
- GREENBLATT, R.J.; WORK, T.M.; DUTTON, P.; SUTTON, C.A.; SPRAKER, T.R.; CASEY, R. N.; DIEZ, C.E.; LEGER, J.S.; PARKER, D.; BALAZS, G.H.; CASEY, J.W. Geographic variation in marine turtle fibropapillomatosis. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Washington, v. 35, n.3, p. 527-530, 2005.
- GULKO, D.; ECKERT, F. **An ecological guide**. Honolulu: Mutual Publishig., 2004. 112p.
- HERBST, L.H.; JACOBSON, E.R.; MORETTI, R.; BROWN, T.; SUNBERG, J.P.; KLEIN, P.A. 1995. Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v. 22, p. 1-12, 1995.

HERBST, L.H.; KLEIN, P.A. Green turtle fibropapillomatosis: Challenges to assessing the role of environmental cofactors. **Environmental Health Perspectives**, Washington, v. 104, suppl, 4, p. 27-30, 1995.

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

HERBST, L.H.; ENE, A.; SU, M.; DESALLE, R.; LENZ, J. 2004. Tumor outbreaks in marine turtles are not due to recent herpesvirus mutations. **Current Biology**, London, v. 14, p. R697-R699, 2004.

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

ICTV. **Virus Taxonomy**: 2014 Release. 2014. Disponível em: <ictvonline.org/virustaxonomy.asp>. Acesso em: 11 nov. 2015.

IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em: 10 nov. 2015.

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

JENSEN, M.P.; FITSSIMMONS, N.N.; DUTTON, P.H. Molecular Genetics of Sea Turtles. In: WYNEKEN, J.; LOHMANN, K.J.; MUSICK, J.A. (Ed). **The biology of sea turtles**. Boca Raton: CRC Press, 2013. v.3. 475p.

JORDÃO, J.C. **Estrutura populacional e história demográfica da tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) no Atlântico Oeste**. 2013. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

LAHANAS, P.N.; MIYAMOTO, M.M.; BJORNDAL, K.A.; BOLTEN, A.B. Molecular evolution and population genetics of Greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. **Genetica**, New York, n. 94, p. 57-67, 1994.

LIMPUS, C.J.; MILLER, J.D. The occurrence of cutaneous fibropapillomas in marine turtles in Queensland. In: JAMES, R.(Org). **Proceeding of the Australian Marine Turtle Conservation Workshop**, Gold Coast, Australia. 1990. p. 186-188,

LOHMANN, K.J.; CAIN, S.D.; DODGE, S.A.; LOHMAN, C.M.F. Regional magnetic fields as navigational markers for sea turtles. **Science**, New York, v. 294, p. 364-366, 2001.

LUTCAVAGE, M.E.; LUTZ, P.L. Diving Physiology. In: LUTZ, P.L.; MUSICK, J.A. **The biology of sea turtles**. Boca Raton: CRC Press, 2003. v.2. 432p.

LUTZ, P.L. Salt, water and pH balance in sea turtles. In: LUTZ, P.L.; MUSICK, J.A. **The biology of sea turtles**. Boca Raton: CRC Press, 2003. v.2. 432p.

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

MACGEOCH, D.J.; GATHERER, D. Integrating Reptilian Herpesvirus into the Family Herpesviridae. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n.2, p. 725-731, 2005.

MEYLAN, A.B.; MEYLAN, P.A. Introduction to the evolution, life history, and biology of sea turtles. In: ECKHERT, K.L.; BJORNDAAL, K.A.; ABREU-GROBOIS, F.A.; DONNELLY, M. (Ed.). **Research and Management techniques for the conservation of sea turtles**. 1999. (IUCN/SSC Marine turtle specialist group publication, 4.)

MORTIMER, J.A. Factors influencing beach selection by nesting sea turtles. In: BJORNDAAL, K. (Ed.). **Biology and conservation of sea turtles**. Washington: Smithsonian Institution Press. 1982. 583p.

MILLER, J.D. Reproduction in sea turtles. In: LUTZ, P.L.; MUSICK, J.A. **The biology of sea turtles**. Boca Raton: CRC Press, 2003, v.2. 432p.

MURAKAWA, S.K.K.; BALAZS, G.H.; ELLIS, D.M.; HAU, S.; EAMES, S.M. 2000. Trends in fibropapillomatosis among green turtles stranded in the Hawaiian Islands, 1982-98. In: KALB, H.J.; WIBBLES, T. (ed). IN: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 19., 2000. South Padre Island, Texas. **Proceedings...** . South Padre Island, Texas p.239-241.

NARO-MACIEL, E.; BECKER, J.H.; LIMA, E.H.S.M.; MARCOVALDI, M.A.; DESALLE, R. Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. **Journal of Heredity**, Washington, v. 98, n.1, p. 29-39, 2007.

NARO-MACIEL, E., BONDIOLI, A.C.V, MARTIN, M., ALMEIDA, A.P., BAPTISTOTTE, C., BELLINI, C., MARCOVALDI, M. A., SANTOS, A. J. B., AMATO, G. The interplay of homing and dispersal in green turtles: A focus on the Southwestern Atlantic. **Journal of Heredity**, October 8, 2012.

NATHANSON, N. Viral pathogenesis and Immunity. local: Elsevier, 2007. 266p.

NORTON, T.M.; JACOBSON, E.R.; SUNBERG, J.P. 1990. Cutaneous fibropapilloma and renal mixofibroma in a green turtle, *Chelonia mydas*. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 26, p.265-270, 1990.

PATRICIO, A.R.; HERBST, L.H.; DUARTE, A.; VÉLEZ-ZUAZO, V.; SANTOS LOUREIRO, N.; PEREIRA, N.; TAVARES, L.; TORANZOS, G.A. Global phylogeography and evolution of chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus. **Journal of General Virology**, London, n. 93, p. 1035-1045, 2012.

PAGE-KARJIAN, A.; TORRES, F.; ZHANG, J.; RIVERA, S.; DIEZ, C.; MOORE, P.A.; MOORE, D.; BROWN, C. 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**, Berlin, v. 1, p.35, 2012.

- PLOTKIN, P. Adult migration and habitat uses. In: LUTZ, P.L.; MUSICK, J.A. **The biology of sea turtles**. Boca Raton: CRC Press, 2003, v.2. 432p.
- PRITCHARD, P.C.H.; MORTIMER, J.A. Taxonomy, external morphology and species identification. In: Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. (IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication. 4). 2000.
- QUACKENBUSCH, S.L.; CASEY, R.N.; MURCEK, R.J.; PAUL, T.A.; WORK, T.M.; LIMPUS, C.J.; CHAVES, A.; DUTOIT, L.; VASCONCELOS PERES, J.; AGUIRRE, A.A.; SPRAKER, R.T.; HORROCKS, J.A.; VERMEER, L.A.; BALAZS, G.H.; CASEY, J.W. 2001. Quantitative analysis of herpesvirus sequences from normal tissue and fibropapillomas of marine turtles with real time PCR. **Virology**, New York, v. 287, p. 105-111, 2001.
- RODENBUSCH, C.R.; BAPTISTOTTE, C.; WERNECK, M.R.; PIRES, T.T.; MELO, M.T.D.; ATAÍDE, M.W.; dos REIS, K.D.H.L.; TESTA, P., ALIEVE, M.M.; CANAL, C.W. Fibropapillomatosis in green turtles *Chelonia mydas* in Brazil: characteristics of tumors and virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v. 111, p. 207-217, 2014.
- SMITH, G.M.; COATES, C.W. Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles, *Chelonia mydas*. **Zoologica**, New York, v. 23, p. 93-98, 1938.
- SPOTILA, J.R. **Sea turtles: a complete guide to their biology, behavior and conservation**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2004. 227p.
- STRAUSS, E.G.; STRAUSS, J.H. **Viruses and Human Disease**. 2.ed. Amsterdam: Elsevier, 2006. 461p.
- VAN HOUTAN, K.S.; HARGROVE, S.K.; BALAZS, G.H. 2010. Land Use, Macroalgae, and a Tumor-Forming Disease in Marine Turtles. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 9, Sept., p. 1-9, 2010.
- WORK, T.M.; BALAZS, G.H. Relation tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. 1999. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 35, n.4, p. 804-807, 1999.
- WORK, T.M.; RAMEYER, R.A.; BALAZS, G.H.; CRAY, C.; CHANG, S.P. Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 37, p. 534-581, 2001.
- WORK, T.M., BALAZS, G.H.; WOLCOTT, M.; MORRIS, R. Bacteremia in free-ranging Hawaiian green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis. **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v. 53, p. 41-46, 2001.
- WORK, T.M.; DAGENAIS, J.; BALAZS, G.H.; SCHUMACHER, J.; LEWIS, T.D; LEONG, J.C.; CASEY, R.N.; CASEY, J.W. *In vitro* biology of fibropapilloma-associated turtle herpesvirus and host cells in Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). **Journal of General Virology**, London, v. 90, p. 1943-1950, 2009.
- WORK, T.M. Cancer in sea turtles. **Hawaii Medical Journal**, Honolulu, v. 64, p. 23-24, 2005.
- WORK, T.M.; BALAZS, G.H. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 35, p. 804-807, 1999.
- WYNEKEN, J. 2001. The anatomy of sea turtle. **NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470**. 172p.

3 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) EM SECREÇÕES DE *Chelonia mydas* NA COSTA ATLÂNTICA BRASILEIRA

Resumo

A tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) é a espécie mais afetada pela fibropapilomatose, doença que pode ser considerada fatal em função da severidade das lesões. O agente primário mais provável desta doença é um herpesvírus, o CFPHV (*Chelonid fibropapilloma associated herpesvirus*). Herpesvírus são reconhecidos por apresentar um ciclo de latência, caracterizado pela ausência de replicação em um determinado tecido, e por um ciclo lítico, em que partículas virais são liberadas e podem infectar outros hospedeiros. A disseminação de herpesvírus pode ocorrer através de secreções, aerossóis, fezes ou por células infectadas, mas esta característica do vírus tem sido pouco estudada em CFPHV, apontando a sanguessuga *Ozobranchus* sp. como um dos principais vetores do parasita. Com o objetivo de detectar a presença e a prevalência de CFPHV em secreções de tartarugas verdes em diferentes regiões da costa brasileira, foram coletados *swabs* oral e ocular de 96 indivíduos provenientes de Ubatuba-SP (25), Vitória-ES (31) e Fernando de Noronha-PE (40) e a prevalência observada foi 6,25% (6/96), sendo 20% em Ubatuba-SP (5/25) e 2,5% em Fernando de Noronha-PE (1/40), e não foi detectada a presença do agente em secreções de animais de Vitória-ES. A detecção do CFPHV foi realizada através de PCR, sendo verificada a presença de 5 genes – UL18, UL22, UL27, DNA polimerase e F-US3B. Fragmentos dos genes para DNA polimerase e F-US3B foram amplificados e avaliados em relação a substituição de nucleotídeos. Não foram detectadas substituições em fragmentos do gene F-US3B detectados, enquanto fragmentos de 460 pb da DNA polimerase permitiram a detecção de uma variante viral do CFPHV que não havia sido detectada em estudos anteriormente realizados no Brasil e que apresentou 100% de identidade com CFPHV presentes em Porto Rico. O haplótipo dos indivíduos que apresentaram o herpesvírus nas secreções também foram identificados pelo mtDNA. Indivíduos pertencentes aos haplótipos CM-A3 E CM-A8 possuíam o vírus em pelo menos uma das secreções. Os resultados observados permitem inferir que o CFPHV pode ser transportado por indivíduos de tartarugas verdes, particularmente entre diferentes áreas de alimentação, e infectar mais de um haplótipo. Além disto, também é possível sugerir que o agente pode permanecer na água ou ainda ser eliminado através das secreções estudadas, demonstrando que estas podem ser vias de transmissão potenciais do vírus na fase de replicação. Tanto os haplótipos identificados quanto a variante viral estão relacionados ao oceano Atlântico, o que permite apontar que as variantes virais podem circular por esta área.

Palavras-chave: *Chelonia mydas*; CFPHV; Secreções; Replicação viral; mtDNA

Abstract

The green turtle (*Chelonia mydas*) is the most affected species by fibropapillomatosis disease, which can be considered fatal because of the severity of the lesions. The most likely primary agent of this disease is a herpesvirus, the CFPHV (*Chelonid fibropapilloma associated herpesvirus*), pathogen recognized by presenting a latency cycle, characterized by the absence of replication in a specific tissue, and by a lytic cycle, in which viral particles are released and can infect other hosts. The dissemination of the herpesvirus can occur through secretions, aerosols, feces or infected cells, but this feature of the virus has been poorly studied in CFPHV, pointing to leech *Ozobranchus sp.* as one of the main vectors of the parasite. In order to detect the presence and prevalence of CFPHV in green turtles secretions in different regions of the Brazilian coast, oral and ocular swabs of 96 individuals from Ubatuba-SP (25), Vitória-ES (31) and Fernando de Noronha-PE (40) were collected and the observed prevalence was 6.25% (6/96), 20% in Ubatuba-SP (5/25) and 2.5% in Fernando de Noronha-PE (1/40), and the agent's presence in animal secretions was not detected in Vitória-ES. The CFPHV detection was performed by PCR, which verified the presence of 5 genes - UL18, UL22, UL27, DNA polymerase and F-US3B. Fragments of the genes for DNA polymerase and F-US3B were amplified and evaluated regarding the substitution of nucleotides. There were no substitutions in fragments of the detected F-US3B gene, while fragments of 460 bp of DNA polymerase allowed the detection of a viral variant of the CFPHV, which had not been detected in previous studies in Brazil, showing 100% identity with CFPHV present in Puerto Rico. The haplotype of individuals which presented the herpesvirus in secretions were also identified by mtDNA. Individuals belonging to the CM-A3 and CM-A8 haplotypes possessed the virus in at least one of the secretions. The observed results permitted to infer that the CFPHV can be carried by individuals of green turtles, particularly among different feeding areas, and infect more than one haplotype. Furthermore, it is also possible to suggest that the agent can stay in the water or even be eliminated through the analyzed secretions, demonstrating that these can be potential transmission routes of the virus in the replication phase. Both identified haplotypes and viral variant are related to the Atlantic Ocean, leading to the conclusion that the viral variants can move through this area.

Keywords: *Chelonia mydas*; CFPHV; Secretions; Viral replication; mtDNA

3.1 Introdução

Os herpesvírus apresentam uma biologia complexa, em função de sua habilidade de estabelecer infecções latentes por um longo período de vida em seu hospedeiro. Em função disto, os indivíduos infectados podem atuar como reservatórios do vírus, até o momento em que o agente seja reativado, sendo capaz de causar afecção no indivíduo infectado ou se disseminar e infectar outros indivíduos, comumente a partir do tecido epitelial (STRAUSS; STRAUSS, 2006; NORKIN, 2010).

Uma série de fatores é capaz de reativar o vírus, em resposta a condições de estresse, exposição à radiação ultravioleta ou alteração das condições imunológicas do hospedeiro. Durante o ciclo lítico, os herpesvírus são capazes de migrar até os tecidos em que desenvolvem sua replicação, liberando partículas virais que podem então infectar outros hospedeiros. No entanto, estes vírus podem ser eliminados mesmo na ausência de lesões (STRAUSS; STRAUSS, 2006; DERUELLE; FAVOREEL, 2011).

Uma série de doenças pode ser causada pelos herpesvírus, como feridas labiais e úlceras genitais em humanos, quadros respiratórios e abortivos em cavalos, linfomas e Sarcoma de Kaposi também em humanos, e a transmissão pode ocorrer a partir de células infectadas, aerossóis, excreções urogenitais ou saliva (FIELDS et al., 1996; STRAUSS; STRAUSS, 2006).

Em tartarugas-marinhas, os herpesvírus estão associados à fibropapilomatose, doença neoplásica causada por tumores cutâneos benignos e cujos quadros mais severos podem comprometer a locomoção, visão e alimentação do hospedeiro (HERBST, 1994; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997), podendo, por isso, ser debilitante e fatal (AGUIRRE et al., 1998). A doença tem caráter multifatorial, mas a presença de um alfaherpesvírus tem sido detectada em casos de inoculação experimental e em animais de vida livre, que evidenciam a capacidade infecciosa do herpes (HERBST et al., 1995).

A tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) é a espécie que apresenta maior prevalência da doença, sendo documentados casos de até 92% de animais acometidos pela fibropapilomatose (BALAZS, POOLEY, 1991). A presença do CFPHV (*Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus*) também tem sido apontada em tecidos epiteliais sem lesão, e a maior prevalência do agente tem sido documentada nesta espécie, chegando a aproximadamente 30% de indivíduos infectados (ALFARO-NUÑEZ et al., 2014).

A forma como o CFPHV é transmitido entre os indivíduos, no entanto, ainda é pouco conhecida. A sanguessuga *Ozobranchus* sp. tem sido apontada com um candidato a vetor do vírus, por ser encontrada parasitando o epitélio destes animais e em função das elevadas cargas virais detectadas nestes parasitas (GREENBLATT et al., 2004). Em um estudo experimental, detectou-se que os herpesvirus capazes de causar a doença de pulmão-olhos-traquéia podem permanecer no ambiente aquático por até 5 dias, sendo capazes de causar efeito citopático em culturas de célula (CURRY et al., 2000).

A presença de compostos orgânicos e debris celulares podem estabilizar o vírus e aumentar sua sobrevivência (LIPSON; STOTSZKY, 1984; CLARK et al., 1998). Por outro lado, a presença de microrganismos capazes de produzir substâncias antivirais pode diminuir o tempo de persistência do agente infeccioso no ambiente marinho (GIRONES et al., 1989). Outros fatores ambientais, como temperatura, correntes marítimas, profundidade, luminosidade e pH também podem interferir na permanência de partículas virais viáveis no ambiente (CURRY et al., 2000).

Como as tartarugas verdes permanecem por longos períodos em áreas de alimentação, diversos estudos apontam estas áreas como àquelas em que a infecção por CFPHV provavelmente acontece. A composição destas agregações nas áreas de alimentação pode ser determinada a partir da análise de sequências da região controle do DNA mitocondrial, que definem os haplótipos desta espécie, tornando possível determinar as prováveis áreas reprodutivas da procedência destes indivíduos.

As maiores prevalências de fibropapilomatose são observadas nestas áreas. Em geral, a doença acomete principalmente indivíduos com comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) entre 30 a 80 centímetros, mas a presença de tumores também é detectada em indivíduos maiores.

Muitas destas áreas de alimentação encontram-se bastante impactadas pelas atividades humanas, seja pelas alterações físicas do habitat e de uso do solo, seja pelo lançamento de efluentes sanitários e industriais a que os animais estão sujeitos durante este período (BALAZS, 1991; HERBST; KLEIN, 1995; ADNYANA, LADDS; BLAIR, 1997; VAN HOUTAN et al., 2010). Como muitos dos indivíduos menores de *C. mydas* podem tomar contato pela primeira vez com o CFPHV nestas áreas, ou ainda pelo fato de que estas alterações ambientais possam comprometer a imunidade do hospedeiro, favorecendo o desenvolvimento de doenças, é importante detectar quais são as possíveis vias de disseminação e infecção do agente viral.

A importância de compreender a disseminação e etiologia das doenças em animais silvestres está diretamente ligada a conservação das espécies. A presença de patógenos é esperada em populações selvagens, e, particularmente em herpesvírus, a relação parasita-hospedeiro possui uma especificidade bastante singular. No entanto, a mortalidade elevada e a interferência das doenças na estrutura populacional de cada espécie devem ser alvo de estudos constantes, particularmente para o caso em que patógenos circulam por áreas amplas e por longo período de tempo (CAUGHLEY; SINCLAIR, 1994).

Considerando os fatores e aspectos citados, é importante detectar e monitorar a prevalência da doença e do CFPHV, a relação entre severidade da doença, variações no genoma viral e mecanismos de disseminação e infectividade do vírus para avaliar os possíveis impactos negativos para a espécie e sua conservação.

Os objetivos deste trabalho foram determinar a prevalência de CFPHV nas secreções oral e ocular de *Chelonia mydas* provenientes de diferentes áreas da costa brasileira, e desta forma discutir as possíveis vias de dispersão e infecção do agente; caracterizar as variações de sequências da DNA polimerase de CFPHV e compreender as relações entre determinados haplótipos de tartarugas verdes e estas variações.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Áreas de estudo e coleta de dados

Foram coletadas amostras de pele e secreções oral e ocular de tartarugas verdes provenientes de 3 localidades da costa brasileira: Ubatuba (SP), Vitória (ES) e Fernando de Noronha (PE).

Os animais provenientes da região de Ubatuba (SP) foram capturados de forma incidental ou por resgate nos municípios de Ubatuba/SP, São Sebastião/SP e Angra dos Reis/RJ, sendo encaminhados ao Centro de Reabilitação do Projeto TAMAR/ICMBio, base de Ubatuba. A região caracteriza-se como área de alimentação de *C. mydas*, com alterações antrópicas em função do adensamento populacional ligado a moradias permanentes e população flutuante em função do turismo na região (GALLO et al., 2006).

Em Vitória, no Espírito Santo, as capturas foram realizadas na Companhia Siderúrgica ArcelorMittal Tubarão, município de Serra, localizado a 10 km de Vitória (TORENZANI,

2010). O local de coleta encontra-se na saída de efluentes da companhia, sendo uma importante área de alimentação de tartarugas verdes no litoral capixaba.

Fernando de Noronha (PE) é uma ilha de origem vulcânica localizada a 345 km a oeste de Cabo São Roque/RN e a 545 km de Recife/PE. A ilha abriga duas Unidades de Conservação Federais: uma APA, criada em 1986, e um Parque Nacional Marinho, criado em 1988. É considerada área mista, por representar uma área de alimentação e reprodução de *Chelonia mydas*.

Todos os animais estudados nestas áreas tiveram os seguintes dados biométricos levantados: Comprimento Curvilíneo da Carapaça (CCC), Largura Curvilínea da Carapaça (LCC) e Massa Corpórea (MC). Dados de presença e ausência de tumores também foram anotados.

3.2.2 Coleta de secreções

Os *swabs* colhidos foram armazenados em microtubos contendo solução salina 0,9% e mantidos a -20°C até chegarem ao Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres (LAPCOM), localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde foram mantidos a -80 °C até o processamento.

O processamento prévio das amostras para extração de DNA foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia (LABMAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os tubos foram submetidos a agitação em vórtex e a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido, a - 80 °C, e descongelamento a 56°C, sendo posteriormente clarificadas a 5000g durante 15 minutos, a 4°C, e uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi submetida ao protocolo de extração de DNA.

3.2.3 Extração de DNA

Em uma alíquota de 100 µL do sobrenadante de cada amostra foram adicionados 500 µL de solução de lise (SDS 1%; 100mM EDTA pH 8.0; 20 mM Tris-HCl pH 8.0; água Milli-Q) e 10 µL de Proteinase K. A solução foi homogeneizada em vórtex e incubada *overnight* a 37°C em termobloco.

Após a incubação, foram adicionados 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio em cada microtubo, que foi posteriormente homogeneizado em vórtex, centrifugado por 10 minutos a 12000g, a 4°C, para a separação de fases. Uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi colocado em outro tubo e adicionou-se 500 µL de propanol. Esta solução permaneceu a - 20 °C por no mínimo 2 horas e, em seguida, centrifugada por 30 minutos a 12000g, a 4°C, para precipitação do pellet.

O sobrenadante foi descartado por inversão e cada pellet foi submetido a lavagem com 1 mL de etanol 70%. A amostra foi novamente centrifugada por 10 minutos e, em seguida o sobrenadante foi desprezada por inversão de tubo.

Cada pellet obtido deste procedimento foi submetido a secagem em termobloco a 56 °C, por 10 minutos, e o material obtido foi eluído em 30 µL de TE pH 8.0 (10mM Tris-HCl; 1 mM EDTA), incubado por 10 minutos a 56 °C e armazenado a - 20 °C até a realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR).

O DNA obtido foi quantificado em NanoDrop 2000C Spectrophotometer (Thermo Scientific) e somente amostras com mais de 0 µg/µL foram submetidos a Reação de PCR.

3.2.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Amostras de pele dos animais estudados foram coletadas e submetidas a análise do genótipo de mtDNA para caracterização dos haplótipos. Os *primers* utilizados e o tamanho dos fragmentos amplificados encontram-se na Tabela 3.1.

A amplificação foi realizada segundo o protocolo: 94°C a 2 min, seguido de 40 ciclos a 94°C (1 min), 57°C (1 min) e 72°C (1 min), e uma extensão final de 72°C a 10 min.

Tabela 3.1 – Sequência dos *primers* senso e anti-senso para região controle do DNA mitocondrial de *Chelonia mydas*

<i>Primers</i>	Gene-alvo	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do fragmento	Referência
LCM15382 /H950	Região controle do DNA mitocondrial	F:GCTTAACCCTAAAGCATTGG R:GTCTCGGATTTAGGGGTTTG	~700pb	Abreu-Grobois et al., 2006

Para detecção dos genes UL18, UL22, UL27, GTHV e F-US3B de *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) foram utilizados os *primers* apresentados na Tabela 3.2, em que se encontra também a caracterização do gene alvo a ser amplificado.

Tabela 3.2 – Sequência de *primers* e caracterização dos genes-alvo para CFPHV.

<i>Primers</i>	Gene-alvo	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do fragmento	Referência
UL18	Proteína de capsídeo gene UL18	F: GTGGAACCCCGCCGGGTAAT R: TGATCCGGGCCGAGTAGCGG	140pb	Alfaro-Nunez; Gilbert, 2014
UL22	Glicoproteína H gene UL22	F: AACFCCCTTTCTCCGACCCATATT R: GCTGGGGGAGCATCGTGCAAA	179pb	Alfaro-Nunez; Gilbert, 2014
UL27	Glicoproteína B gene UL27	F: CTAGATACATACTGGCCRTGCTCGTC R: GCCAGCGACCATCCGGAG	143pb	Alfaro-Nunez; Gilbert, 2014
GTHV	DNA polimerase de CFPHV	F: GACACGCAGGCCAAAAAGCGA R: AGCATCATCCAGGCCACAA	~480pb	Quackenbush et al., 2001
F-US3B	Similar a uma serina/treonina quinase	F: TAGAGGTTTCGGCTTTGGCTG R: CGCCATTTCAGTTGCTCGAAG	~700pb	Este estudo

A amplificação de cada uma das sequências-alvo foi realizada conforme o seguinte protocolo: os genes UL18, UL22 e UL27 de acordo com Alfaro-Nuñez; Gilbert, 2014, o gene da DNA polimerase de CFPHV conforme Rodenbusch et al., 2014 e o gene F-US3B com 94°C

a 5 min, seguido de 35 ciclos a 94°C (1 min), 62°C (1 min) e 72°C (1 min), e uma extensão final de 72°C a 10 min.

3.2.5 Leitura e análise dos produtos da PCR

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal (25 µL DNA amplificado acrescido de 2 µL de corante Gel Loading Buffer [Invitrogen Carlsbad, CA] em gel de agarose 2,0% (2,0 mg de Agarose Ultra-Pure [Invitrogen Carlsbad, CA]; 100 mL TBE 0,5X [44,58 M Tris-Base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA]) acrescido de tampão de corrida TBE 0,5X pH 8.0 à 110V/50mA. O gel foi corado com SYBR Safe DNA Gel Stain [Invitrogen Carlsbad, CA] e visualizado com luz ultravioleta (UV) em câmara escura (Alphalmager). As amostras que revelaram bandas de DNA do tamanho do fragmento de cada gene e de acordo com o controle positivo, foram consideradas positivas para a reação de PCR utilizada.

3.2.6 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos

Os produtos da PCR foram recortados do gel de agarose e purificados utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification [GE Healthcare]. Após a purificação, os nucleotídeos foram submetidos ao sequenciamento utilizando o Kit BigDye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems/Austin, TX) de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático (Applied Biosystems/Perkin Elmer, modelo ABI Prism 310 Genetic, FosterCity, CA).

3.2.7 Análise das sequências

As sequências obtidas foram submetidas à análise qualitativa do eletroferograma pelo programa PHRED (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>) e apenas aquelas com valores superiores a 20 foram aceitas e analisadas utilizando os programas BioEdit 5.0.6 (HALL, 2001) e MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2011), alinhadas com Clustal W (THOMPSON et al., 2002), gerando um *contig* a partir das sequências senso e antisenso. Os *contigs* foram submetidos à

análise de similaridade através do programa BLAST- Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL, 1990) para avaliar a homologia entre as sequências obtidas e àquelas disponíveis no GenBank.

3.2.8 Análise filogenética

As sequências dos genes estudados foram alinhadas com sequências similares disponíveis no GenBank. A árvore filogenética foi elaborada com o programa MEGA v.6.0 (TAMURA, 2011) utilizando o Método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-joining tree*), o modelo Jukes-Cantor e a confiabilidade dos ramos da árvore filogenética foi testada com 1000 repetições de *bootstrap*.

3.3 Resultados

3.3.1. Prevalência de CFPHV nas amostras e genes detectados.

Dos 192 *swabs* de secreções estudados, 184 deles foram submetidos a reação em cadeia pela polimerase. Todos os 96 animais coletados tiveram ao menos um *swab* analisado.

Foram considerados positivos os *swabs* que apresentaram pelo menos um dos 5 genes de alfa herpesvírus estudados. A Tabela 3.3 apresenta os resultados quantitativos de animais positivos para o CFPHV.

Tabela 3.3 – Resultados positivos para CFPHV, de acordo com o local de coleta e secreção avaliada (oral ou ocular)

LOCAL	Número de animais	POSITIVOS ORAL	POSITIVOS OCULAR
FN	40	1	0
ES	31	0	0
SP	25	3	5
TOTAL	96	4	5

Analisando os resultados obtidos, foi possível observar que apenas a secreção oral de um animal proveniente de FN apresentou o CFPHV, e que todas as outras amostras positivas foram detectadas em secreções de animais provenientes de Ubatuba-SP. Todas as amostras provenientes de Vitória-ES apresentaram resultados negativos para alfa herpesvírus.

Com relação aos genes estudados, a Tabela 3.4 aponta que somente nos animais provenientes de Ubatuba-SP foi detectado a presença de um ou mais genes na secreção ocular e o gene UL18 foi detectado em todas as amostras desta secreção.

Tabela 3.4 – Resultados positivos para a presença dos genes UL18, UL22, UL27, GTHV E F-US3B em secreção ocular

IDENTIFICAÇÃO	UL18	UL22	UL27	DNA pol	F-US3B
FN033	-	-	-	-	-
UBA64	+	-	-	+	+
UBA65	+	-	-	-	+
UBA70	+	-	-	-	+
UBA71	+	-	-	-	-
UBA72	+	-	-	+	+

Já a tabela 3.5 apresenta os resultados positivos para CFPHV em *swabs* de secreção oral. Pode-se observar que em um indivíduo de Fernando de Noronha foi possível detectar a presença do gene UL18, enquanto nos indivíduos provenientes de Ubatuba foram detectados os genes UL18, GTHV e F-US3B.

Nos animais identificados como UBA64, UBA70 e UBA71 foi detectada a presença de genes de CFPHV nas secreções oral e ocular.

Tabela 3.5 - Resultados positivos para a presença dos genes UL18, UL22, UL27, GTHV E F-US3B em secreção oral

IDENTIFICAÇÃO	UL18	UL22	UL27	DNA pol	F-US3B
FN033	+	-	-	-	-
UBA64	+	-	-	-	+
UBA65	-	-	-	-	-
UBA70	-	-	-	+	-
UBA71	-	-	-	+	+
UBA72	-	-	-	-	-

Ao avaliar a prevalência em cada uma das localidades amostradas, no Espírito Santo não foi detectada a presença de CFPHV nas secreções dos animais estudados, 2,5% das amostras (1/40) foram positivas para CFPHV em Fernando de Noronha e em 20% dos animais avaliados em Ubatuba (5/25) foi possível detectar a presença de um ou mais genes de CFPHV.

Exceto no animal proveniente de Fernando de Noronha, que não apresentava lesão fibropapilomatosa, todos os outros 5 (cinco) indivíduos positivos para herpesvírus possuíam também tumores epiteliais distribuídos ao longo do corpo.

3.3.2 Caracterização molecular de CFPHV e sua relação com os haplótipos de mtDNA

Os genes UL18, UL22, UL27 e F-US3B foram utilizados apenas para diagnóstico do CFPHV. O *primer* GTHV, utilizado para detectar sequências da DNA polimerase específica de herpesvírus de tartaruga marinha e os produtos amplificados deste gene foram purificados e sequenciados. Foram obtidas sequências passíveis de análise em 4 (quatro) das cinco amostras positivas, as quais foram utilizadas para caracterizar o herpesvírus.

Os haplótipos de mtDNA dos indivíduos em que foi detectada a presença de herpesvírus foram identificados a partir da comparação das sequências obtidas com aquelas depositadas nos bancos de dados do Archie Carr Center for Sea Turtle Research (<http://accstr.ufl.edu/resources/mtdna-sequences/>) e no GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).

A árvore filogenética foi construída no programa MEGA 6.0, a partir de fragmentos com 460 pb, referente à sequência parcial do gene da DNA polimerase, e comparada com outras sequências do mesmo gene que apresentaram alto grau de semelhança com as sequências obtidas neste estudo.

A figura 3.1 mostra as relações filogenéticas obtidas entre as sequências detectadas neste estudo, àquelas provenientes de um trabalho anterior no Brasil (RODENBUSCH et al., 2014) e em estudos realizados com animais dos Estados Unidos (Flórida), México, Porto Rico, Hawaii, Austrália, Barbados e Golfo da Guiné.

As amostras deste estudo foram nomeadas, na árvore, com o haplótipo do indivíduo em que foram encontradas, a identificação do indivíduo e a secreção em que foram detectadas.

Para avaliar a identidade entre as sequências identificadas neste estudo e àquelas obtidas no GenBank, foi selecionado um fragmento de 460 pb do genoma parcial da DNA polimerase do CFPHV, e uma matriz de identidade foi gerada no MEGA 6.0.

Este tamanho de fragmento foi capaz de detectar mudanças de bases entre as sequências depositadas e as geradas neste estudo. As sequências JN580279, JN580280, JN580281, JN580282 e JN580283 depositadas no GenBank apresentam 473 pb, enquanto as outras possuem maior número de pares de bases. Como a região entre 456 pb a 473 pb apresentou uma sequência conservada de nucleotídeos (5'- ACCCGAATCGCTTTTTGG - 3'), nas amostras estudadas, e verificou-se que não havia discrepância na topologia das árvores geradas, as estas sequências foram utilizadas para a geração da árvore filogenética.

A análise da identidade e a árvore filogenética gerada permitiu constatar que as sequências JN580279, JN580280, JN580281 e JN580282 apresentaram 100% de identidade com as sequências obtidas neste estudo, conforme Figura 3.1. Na análise considerando sequências de 483 pb, foi possível detectar uma nova variante de CFPHV na costa brasileira. As sequências com 473 pb, provenientes de Porto Rico, foram caracterizadas por Patrício et al., 2012.

Foi detectada a presença desta mesma sequência em todos as secreções positivas para CFPHV. Os resultados positivos foram encontrados nas secreções de dois indivíduos do haplótipo CMA-08, relacionados às áreas de reprodução de Trindade (ES-Brasil), Arquipélago de Ascensão, no meio do Oceano Atlântico e pertencente à Inglaterra, Atol das Rocas (RN-Brasil), Bioko (Guiné Equatorial) e Guiné Bissau, e de um indivíduo do haplótipo CMA-03, relacionados às áreas de reprodução da Costa Rica.

Figura 3.1 – Análise Filogenética de sequência de 460 pb da DNA polimerase de CFPHV em *swabs* oral e ocular de *Chelonia mydas* no litoral de Ubatuba-SP. A árvore foi gerada pelo método de *Neighbour-joining*, modelo de Jukes-Cantor, com 1000 repetições de *bootstraps*. Em vermelho, as sequências obtidas neste estudo. BR:Brasil; PR: Porto Rico; AUS: Austrália; BRB: Barbados; FL: Flórida; MX: México; GG: Golfo da Guiné

3.4 Discussão

3.4.1 Prevalência, manutenção do vírus no ambiente aquático e ciclo lítico

A fibropapilomatose tem sido monitorada há pelo menos uma década em diversas regiões litorâneas do mundo. No entanto, a prevalência do CFPHV em animais aparentemente saudáveis foi recentemente publicada por Alfaro-Núñez et al., 2014 e não foram encontrados trabalhos na literatura científica determinando a prevalência do herpesvírus em secreções de tartarugas marinhas.

A presença deste agente tanto nas secreções oral quanto ocular pode estar diretamente relacionada ao ciclo lítico do CFPHV e apresentar uma das possíveis vias de infecção e disseminação do vírus. Secreções são apontadas como um dos carreadores de partículas virais, particularmente de herpesvírus. Em HSV-1 de humanos, a replicação e disseminação de partículas virais ocorre normalmente a partir do contato com secreções de indivíduos com quadro clínico representado por feridas labiais ou por lesões genitais. Em aves, a inalação de partículas virais e o contato com secreção nasal, saliva, urina e fezes são apontadas como formas predominante de transmissão (RITCHIE, 1995; KALETA, 2007).

A forma como a transmissão ocorre no ambiente marinho, no entanto, é pouco elucidada para o CFPHV. As sanguessugas do gênero *Ozobranchus* sp. tem sido apontadas como vetores de transmissão, mas deve-se considerar que a transmissão de herpesvírus através de secreções é bastante comum. A possibilidade da manutenção de partículas virais viáveis por curtos períodos, no ambiente marinho, não pode ser descartada.

Considerando a hipótese de que estas partículas virais permanecem por um período na água marinha, e que as agregações de *C. mydas* nas áreas de alimentação permitem o contato entre os indivíduos, pode-se considerar que esta seja uma potencial via de transmissão do agente. Como os herpesvírus podem manter infecções latentes em seu hospedeiro, outro aspecto que deve ser considerado é que, mesmo que a taxa de infecção seja baixa, ainda assim o vírus pode permanecer associado à sua espécie hospedeira por longo período, sendo assim capaz de manter a relação parasita-hospedeiro ao longo do tempo.

Nossos resultados apontam que a maior prevalência de CFPHV em secreções foi encontrada em Ubatuba-SP. Enquanto as coletas de amostras ocorreram no próprio campo, em Fernando de Noronha e Vitória, os animais estudados provenientes de Ubatuba permaneciam

em tanques por alguns dias antes da coleta. A maior prevalência do vírus (20%) observada em animais desta localidade pode refletir esta contenção prévia, permitindo que outros indivíduos se contaminassem. Também não pode ser excluída a possibilidade de, nestas condições, ocorrer a liberação de partículas virais pelas secreções, em função de um suposto estresse a que o animal foi submetido (DERUELLE; FAVOREEL, 2011), mas esta hipótese precisa de maiores pesquisas para ser comprovada.

A região de Ubatuba-SP é particularmente sujeita a lançamento de efluentes sanitários sem tratamento prévio. Nestas condições, pode-se também inferir que as partículas virais permaneçam por um período no meio aquático, sendo capazes de infectar outros indivíduos. A presença de matéria orgânica presente neste tipo de efluente pode aumentar o tempo de viabilidade do vírus, fato observado para reovírus (LIPSON; STOTZKY, 1984).

O fato de não ter sido detectada a presença de CFPHV em secreções de animais provenientes de Vitória-ES é controverso. Estudos recentes mostram que a prevalência de fibropapilomatose em animais que se alimentam na saída do efluente da Companhia Siderúrgica ArcelorMittal Tubarão é bastante alta (44,1%) (DE DEUS SANTOS et al., 2015). No entanto, pode-se supor que a temperatura da água e a composição e características físicas do efluente possam reduzir o tempo de viabilidade das partículas virais, mas talvez favorecer o curso clínico da doença nos animais infectados.

A presença de uma amostra de secreção positiva para CFPHV em Fernando de Noronha-PE também não era esperada. Nesta região não foi documentada, até o presente momento, a presença de animais com fibropapilomatose. No entanto, não se pode excluir as seguintes hipóteses: 1- o resultado representar um falso positivo; 2- animais saudáveis possam eliminar o agente; 3- a baixa prevalência do vírus neste local não permita a manutenção da doença; 4- animais presentes nesta área possuam menor susceptibilidade a infecção por CFPHV ou 5- uma possível variante viral desta localidade apresente baixa capacidade de causar infecção. A ausência do vírus na pele de animais desta localidade (ver capítulo 5) deve ser considerada, pois reforça as hipóteses 1, 3, 4 e 5, mas somente estudos mais amplos, utilizando microscopia eletrônica e o sequenciamento de possíveis resultados positivos podem efetivamente confirmar a presença do vírus em glândulas ocular e oral.

A presença do CFPHV nas secreções aponta para uma possível via de eliminação do agente. Como os cinco animais de Ubatuba-SP apresentavam fibropapilomatose, a detecção do vírus nestes animais permite supor que, nestas condições clínicas, os indivíduos podem eliminar

o agente. A detecção de variantes iguais em secreções e tecidos (pele e tumor) pode ajudar a reforçar esta hipótese.

3.4.2 Correlação entre as sequências de CFPHV e mtDNA de *Chelonia mydas*

A análise das sequências de 460 pb da DNA polimerase do CFPHV obtidas neste estudo acrescentam mais uma variante àquelas identificadas em um estudo anteriormente realizado no Brasil por Rodenbusch et al., 2014. Isto significa que, além das variantes 1, 2 e 4 (depositadas no GenBank como JN938584, JN938585 e JN938587, respectivamente), presentes em Ubatuba-SP, a variante detectada neste estudo amplia a diversidade de CFPHV que pode ser encontrada na costa brasileira.

Esta nova variante na costa brasileira, no entanto, apresenta 100% de identidade com as sequências obtidas por Patricio et al., 2012, depositadas no GenBank como JN580279, JN580280, JN580281 e JN580282 e referentes a CFPHV detectados em Porto Rico (Figura 3.1).

Estudos apontam que existe um certo isolamento geográfico das variantes virais, particularmente em relação a distância entre as áreas em que estas variantes foram identificadas, e ainda que indivíduos de espécies diferentes podem compartilhar a mesma variante em cada uma destas áreas (PATRÍCIO et al., 2012; ENE et al., 2005; HERBST et al., 2004). Neste estudo, no entanto, observou-se que uma variante pode ser compartilhada entre áreas geográficas distantes, provavelmente sendo carregadas por indivíduos infectados que se deslocam entre diferentes áreas de alimentação.

A composição do estoque misto nas áreas de alimentação, em que indivíduos de origens reprodutivas distintas compartilham a mesma área por um longo período de tempo (NAROMACIEL et al., 2007), permite a infecção destes indivíduos nestas áreas de alimentação (CHALOUPKA et al., 2008; ENE et al., 2005). Como os indivíduos podem circular entre diferentes áreas de alimentação, percorrendo quilômetros entre elas (PAPI, LUSCHI, 1996; LUSCHI et al., 1998; GALLO et al., 2006), também pode-se supor que o herpesvírus seja transportado entre estas áreas e eliminado em áreas mais distantes, hipótese plausível considerando o comportamento migratório de *Chelonia mydas* e os ciclos latente e lítico característicos desse vírus.

A presença da mesma variante viral detectada em secreções de indivíduos pertencentes a haplótipos diferentes (CM-A8 e CM-A3), demonstra-se também que o CFPHV pode infectar animais provenientes de diferentes áreas de reprodução, pelo menos no Oceano Atlântico, tendo em vista que tanto a variante viral detectada quanto os haplótipos de *C. mydas* encontram-se nesta região.

O fragmento de 460 pb da DNA polimerase de CFPHV, usado na análise deste trabalho, permitiu analisar um maior número de sequências obtidas neste trabalho e em estudos anteriores, sendo possível caracterizar adequadamente as variantes do Atlântico. Isto porque, na elaboração da árvore filogenética, as variantes de Porto Rico apresentavam sequências de 473 pb depositadas no GenBank, enquanto as outras sequências utilizadas possuíam 483 pb. No entanto, analisando as sequências do Atlântico, após alinhamento, constatou-se que, com exceção daquelas provenientes da Flórida (AY646890 A AY646894), todas as outras sequências utilizadas apresentaram a região entre 456 pb e 483 pb conservada (5'-ACCCGAATCGCTTTTTGGCCTGCGTGTC-3'). Também cabe ressaltar que as diferenças observadas nas sequências da Flórida, nesta região, não alteraram a topologia da árvore filogenética apresentada.

A presença da variante viral encontrada neste trabalho também pode indicar um fluxo recente entre a região de Porto Rico e Ubatuba-SP. Patrício et al., 2011, apontou, em seu estudo, o fluxo do vírus entre o Golfo da Guiné e Porto Rico. A Figura 3.1 demonstra a proximidade filogenética entre variantes do Brasil, Porto Rico e Golfo da Guiné, e a presença dos haplótipos CM-A8 e CM-A3 nestas áreas, reforçando a hipótese apresentada.

A evolução do vírus após chegar a uma nova área de alimentação também deve ser alvo de estudo. Isto porque a taxa de substituição de nucleotídeos em CFPHV é relativamente rápida, entre $1,62 \cdot 10^{-4}$ a $2,22 \cdot 10^{-4}$ (PATRÍCIO et al., 2012) e pode-se supor modificações nesta nova variante detectada na costa brasileira.

3.5 Conclusões

Os resultados apresentados permitiram detectar a presença de uma nova variante de CFPHV na costa brasileira, provavelmente proveniente de Porto Rico, devido a identidade entre estas variantes. A presença desta nova sequência pode ser bastante recente, tendo em vista que trabalhos anteriores não haviam detectado esta variante.

Também foi possível constatar esta variante em secreções de diferentes haplótipos de tartaruga-verde, podendo-se inferir que sejam capazes de infectar indivíduos provenientes de diferentes áreas de reprodução.

A elevada prevalência de CFPHV em Ubatuba-SP pode estar ligada a manutenção dos animais em cativeiro, a presença de esgoto sanitário no litoral de Ubatuba ou ainda indicar que estes animais podem estar eliminando o agente através das secreções oral e ocular. A sanidade do hospedeiro precisa ser melhor estudada, para entender se animais com fibropapilomatose podem eliminar o agente.

A baixa prevalência do herpesvírus em Vitória-ES pode indicar uma menor viabilidade deste se manter no ambiente e nas secreções desta região, mesmo com a elevada prevalência de fibropapilomatose nesta área. A presença de sequências virais em Fernando de Noronha-PE sugere que o vírus pode estar circulante ou ser eliminado, mas a ausência da doença pode estar ligada a baixa invasividade do vírus e/ou a boa condição sanitária dos animais nesta área, tendo em vista que esta é a região menos impactada por atividades humanas entre as 3 áreas estudadas.

Maiores estudos são necessários para compreender o ciclo lítico de CFPHV e como pode ocorrer a liberação e a infecção de novos indivíduos.

Referências

- ALFARO-NUÑEZ, A.; BERTELSEN, M.F.; BOJESSEN, A.M.; RASMUSSEN, I.; ZEPEDA-MENDOZA, L.; OLSEN, M.T.; GILBERT, M.T.P. Global distribution of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus among clinically healthy sea turtles. **BMC Evolutionary Biology**, Denmark, v. 14, n.206, p.1471-2148, 2014.
- ALFARO-NUÑEZ, A.; GILBERT, M.T.P. Validation of a sensitive PCR assay for the detection of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus in latent turtle infections. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, n. 206, p.38-41, 2014.
- ADNYANA, W.; LADDS, P.W.; BLAIR, D. Observations of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*) in Indonesia. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 75, n. 10, p. 737-742, 1997.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v.215, p. 403-410, 1990.

- BAPTISTOTTE, C. **Caracterização espacial e temporal da fibropapilomatose em tartarugas marinhas da costa brasileira**. 2007. 63p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BOWEN, B.W.; MEYLAN, A.B.; ROSS, J.P.; LIMPUS, C.J.; BALAZS, G.H.; AVISE, J.C. Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. **Evolution**: international journal of organic evolution, Lancaster, v. 46, n. 4, p. 865-881, 1992.
- CHALOUPKA, M.; WORK, T.M.; BALAZS, G.H.; MURAKAWA, S.K.K.; MORRIS, R.A. Cause-specific temporal and spatial trends in green sea turtle strandings in the Hawaiian Archipelago (1982–2003). **Marine Biology**, Berlin, v. 154, p. 887–898, 2008a.
- CHALOUPKA, M.; BJORNDAAL, K.A.; BALAZS, G.H.; BOLTON A.B.; EHRHART, L.M.; LIMPUS, C.J.; SUGANUMA, H.; TROËNG, S.; YAMAGUCHI, M. Encouraging outlook for recovery of a once severely exploited marine megaherbivore. **Global Ecology and Biogeography**, Oxford, v. 17, p. 297–304, 2008b.
- CURRY, S.S.; BROWN, D.R.; GASKIN, J.M.; JACOBSON, E.R.; EHRHART, L.M.; BLAHAK, S.; HERBST, L.H.; KLEIN, P.A. Persistent infectivity of a disease-associated herpesvirus in green turtle after exposure to seawater. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 39, n. 4, p. 792-797, 2000.
- DE DEUS SANTOS, M.R.; MARTINS, A.S.; BAPTISTOTTE, C.; WORK, T.H. Health condition of juvenile *Chelonia mydas* related to fibropapillomatosis in southeast Brazil. **Journal of Diseases Organisms**, Amelinghausen, v. 115, p. 193-201, 2015.
- DERUELLE, M.J.; FAVOREEL, H.W. Keep it in the subfamily: the conserved alphaherpesvirus US3 protein kinase. **Journal of General Virology**, London, v. 92, p. 18-30, 2011.
- ENE, A.; SU, M.; LEMAIRE, S.; ROSE, C.; SCHAFF, S.; MORETTI, R.; LENZ, J.; HERBST, L. H.. Distribution of chelonid fibropapillomatosis associated herpesvirus variants in Florida: molecular genetic evidence for infection of turtles following recruitment to neritic developmental habitats. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 41, n. 3, p. 489-497, 2005.
- GALLO, B.M.G.; MACEDO, S.; GIFFONI, B.B. de; BECKER, J.H.; BARATA, C.R. Sea turtle conservation in Ubatuba, Southeastern Brazil, a feeding area with incidental capture in Coastal Fisheries. **Chelonian Conservation and Biology**, Lunenburg, v. 5, n. 1, p. 93-101, 2006.
- GREENBLATT, R.J.; QUACKENBUSH, S.L.; CASEY, R.N.; ROVNAK, J.; BALAZS, G.H.; WORK, T.M.; CASEY, J.W.; SUTTON, C.A. Genomic variation of the fibropapilloma-associated marine turtle herpesvirus across seven geographic areas and three host species. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 2, p. 1125-1132, 2005.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. **Nucleic Acids Symposium series**, London, v.41, p. 95-98, 2001.

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

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

HERBST, L.H.; ENE, A.; SU, M.; DESALLE, R.; LENZ, J. Tumor outbreaks in marine turtles are not due to recent herpesvirus mutation. **Current Biology**, London, v. 14, n.17, p. 697-699, 2004.

NARO-MACIEL, E.; BECKER, H.J.; LIMA, E.H.S.M.; MARCOVALDI, M.A.; DE SALLE, R. Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. **Journal of Heredity**, Washington, v. 97, p. 29-39, 2007.

PATRICIO, A.R.; HERBST, L.H.; DUARTE, A.; VÉLEZ-ZUAZO, V.; SANTOS LOUREIRO, N.; PEREIRA, N.; TAVARES, L.; TORANZOS, G.A. Global phylogeography and evolution of chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus. **Journal of General Virology**, London, n. 93, p. 1035-1045, 2012.

QUACKENBUSCH, S.L., CASEY, R.N., MURCEK, R.J., PAUL, T.A., WORK, T.M., LIMPUS, C.J., CHAVES, A., DUTOIT, L., VASCONCELOS PERES, J., AGUIRRE, A.A., SPRAKER, R.T., HORROCKS, J.A. VERMEER, L.A., BALAZS, G.H., CASEY, J.W. 2001. Quantitative analysis of herpesvirus sequences from normal tissue and fibropapillomas of marine turtles with real time PCR. **Virology**, New York, v. 287, p. 105-111, 2001.

RODENBUSCH, C.R.; BAPTISTOTTE, C.; WERNECK, M.R.; PIRES, T.T.; MELO, M.T.D.; ATAÍDE, M.W.; DOS REIS, K.D.H.L.; TESTA, P.; ALIEVE, M.M.; CANAL, C.W. Fibropapillomatosis in green turtles *Chelonia mydas* in Brasil: characteristics of tumors and virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v. 111, p. 207-217, 2014.

STRAUSS, E.G.; STRAUSS, J.H. Viruses and Human Disease. 2.ed. Amesterdan: Elsevier, 2006. 461p.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

VAN HOUTAN, K.S.; HARGROVE, S.K.; BALAZS, G.H. Land use, macroalgae, and a tumor-forming disease in marine turtles. **PLos ONE**, San Francisco, 5, n. 9, p. 1-8, Sept. 2010.

4 EVIDÊNCIA DE NEUROTROPISMO E LATÊNCIA DE *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) EM CÉREBRO DE *Chelonia mydas*

Resumo

A habilidade dos herpesvírus de estabelecer infecções latentes tem importantes consequências: o hospedeiro passa a ser um reservatório do vírus, muitas vezes por um longo período ou pela vida toda. O vírus pode sofrer reativação, em determinados momentos, particularmente sob condições de estresse ou redução de imunidade, e o portador passa, então, a eliminar o agente. Também há casos em que o agente pode gerar quadros clínicos severos nos tecidos em que estabelece sua latência, principalmente em tecidos nervosos. Algumas síndromes nervosas estão relacionadas a herpesvírus: ganglioneurite viral em abalones (*Haliotis laevis*, *H. rubra* e *H. diversicolor supertexta*), causada pelo AbHV (*abalone herpesvirus*); encefalites em cavalos, causada por EHV (*equid herpesvirus*); inflamações em tecidos nervosos, incluindo o cérebro, pela infecção por Varicella-zoster (HHV-3) em humanos. A relação entre HSV-1 e o mal de Alzheimer tem sido recentemente evidenciada em humanos, demonstrando a importância de compreender a biologia do herpesvírus nos tecidos nervosos. Neste estudo foram necropsiados 6 animais juvenis (CCC entre 30 e 50 cm) que vieram a óbito no Estado do Espírito Santo, e amostras de cérebro, pele e tumores foram coletadas para detecção de CFPHV. Os resultados apontaram a presença do agente no cérebro de 5 animais, sendo detectada também a presença do vírus em tumores de 3 animais que apresentavam fibropapilomatose. Um dos animais apresentava sintomatologia nervosa, com baixa resposta palpebral. As sequências de DNA polimerase de CFPHV obtidas na análise do eletroferograma sugerem que 5 destes animais poderiam apresentar infecção múltipla por mais de uma variante viral. Em um animal foi possível detectar uma única variante no cérebro, pele e tumor, e a sequência de 483 pb obtida nesta análise revelou uma nova variante na costa brasileira com elevada identidade com variantes detectadas em Porto Rico e Golfo da Guiné. Estes achados permitem sugerir que o vírus estabelece infecções latentes em cérebro de *Chelonia mydas* e que esta espécie pode transportar o agente por longas distâncias. Os haplótipos de tartarugas verdes CM-A5, CM-A8 e CM-A10 foram identificados, demonstrando também que o CFPHV pode infectar animais provenientes de diferentes áreas reprodutivas.

Palavras-chave: *Chelonia mydas*; CFPHV; Latência; Sistema nervoso; mtDNA

Abstract

There are important consequences regarding the ability of the herpesvirus to establish latent infections: the host becomes a vessel for the virus, often for an extended period or for life. The virus can be reactivated at certain times, particularly under conditions of stress or immunity reduction, and the carrier then begins to eliminate the agent. There are also cases in which the agent may develop severe clinical situations on the tissues establishing its latency, particularly in the nervous tissue. Some nerve syndromes are related to the herpesvirus: viral ganglioneuritis in abalone (*Haliotis laevis*, *H. rubra* and *H. diversicolor supertexta*) caused by AbHV (*abalone herpesvirus*); encephalitis in horses, caused by EHV (*equid herpesvirus*);

inflammation in nerve tissues, including the brain, by infection with Varicella-zoster virus (HHV-3) in humans. The relationship between HSV-1 and Alzheimer's disease has recently been demonstrated in humans, demonstrating the importance of understanding the biology of herpesvirus in the nerve tissue. In this study six juvenile animals (CCC between 30 and 50 cm) that died in Espirito Santo were necropsied, and brain, skin and tumors samples were collected for detection of the CFPHV. The results showed the agent's presence in the brain of the 5 animals, being also detected the presence of the virus in tumors on 3 of them with fibropapillomatosis. One of the animals presented nervous symptoms, with low blink reflex. DNA polymerase sequences of CFPHV obtained from the analysis of the electropherogram suggest that 5 of these animals could present multiple infections by more than one viral variant. In one animal, it was possible to detect a single variant in the brain, skin, and tumor, and the sequence of 483 bp obtained in this analysis revealed a new variant on the Brazilian coast with high identity with variants detected in Puerto Rico and Gulf of Guinea. These findings suggest that the virus establishes latent infections in the brain of *Chelonia mydas* and that this species can carry the agent over long distances. The haplotype green turtles CM-A5, CM-A8 and CM-A10 were identified, also demonstrating that CFPHV can infect animals from different reproductive areas.

Keywords: *Chelonia mydas*; CFPHV; latency; Nervous system; mtDNA

4.1 Introdução

Os herpesvírus são capazes de estabelecer infecções latentes por um longo período de vida em seu hospedeiro. A latência do herpesvírus no sistema nervoso encontra-se bem caracterizada para herpes simplex vírus tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) em humanos, normalmente no gânglio nervoso dorsal. Quando o vírus é reativado, podem ser responsáveis por quadros severos como encefalite e uma série de desordens no sistema nervoso periférico, apresentando elevada morbidade e mortalidade (STEINER; BENNINGER, 2013). A prevalência de HSV-1 em humanos é bastante elevada, podendo chegar a 90% (KENNEDY; CHAUDHURI, 2002).

Outros herpesvírus também tem sido relacionados a quadros clínicos severos no sistema nervoso. *Abalone-herpesvirus* (AbHV) podem infectar e causar ganglioneurite em *Haliotis laevigata*, *H. rubra* e *H. diversicolor supertexta*. A sintomatologia da doença envolve baixa adesão do musculatura podal e eversão da rádula, excesso de produção de muco e redução de reflexos e normalmente apresenta mortalidade elevada e grandes perdas econômicas em fazendas destes bivalves na China e Austrália (CHANG et al., 2005; HOOPER et al., 2007; CRANE et al., 2009). Herpes simplex vírus tipo 2 também está associado a anormalidades neurológicas, estabelecendo sua latência no nervo trigêmeo ou no gânglio sacral, podendo causar afecções como meningite e encefalite neonatal (THOMPSON; WHITLEY, 2011;

JAMES; KIMBERLIN; WHITLEY, 2009). *Equid herpesvirus* (EHV) e *herpes-zoster virus* (HZV) são responsáveis por doenças severas do sistema nervoso, como encefalites (STRAUSS; STRAUSS, 2006).

No entanto, a infecção de tecidos nervosos é normalmente latente. A latência caracteriza-se pela manutenção do genoma viral em neurônios, com ausência de replicação e geração de partículas virais infecciosas (BLOOM; GIORDANI; KWIATKOWSKI, 2010) e a reativação do vírus envolve uma série de mecanismos bioquímicos e moleculares (FELDMAN, 2002).

Uma série de fatores é capaz de reativar o vírus, em resposta a condições de estresse, exposição à radiação ultravioleta ou alteração das condições imunológicas do hospedeiro. Durante o ciclo lítico, os herpesvírus são capazes de migrar até os tecidos em que desenvolvem sua replicação, liberando partículas virais que podem então infectar outros hospedeiros. No entanto, estes vírus podem ser eliminados mesmo na ausência de lesões (STRAUSS; STRAUSS, 2006; DERUELLE; FAVOREEL, 2011).

Em tartarugas-marinhas, o *Chelonid associated-fibropapilloma herpesvirus* (CFPHV) tem sido associado à fibropapilomatose, doença neoplásica causada por tumores cutâneos benignos e cujos quadros mais severos podem comprometer a locomoção, visão e alimentação do hospedeiro (HERBST, 1994; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997), podendo, por isso, ser debilitante e fatal (AGUIRRE et al., 1998).

A presença do CFPHV (*Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus*) também tem sido detectada em tecidos epiteliais sem lesão (ALFARO-NUÑEZ et al., 2014), mas a presença do vírus em tecidos nervosos ainda não foi descrita para tartarugas-marinhas, havendo uma lacuna na literatura científica sobre os mecanismos de latência deste herpesvírus nestes animais.

Como as tartarugas verdes permanecem por longos períodos em áreas de alimentação, diversos estudos apontam estas áreas como àquelas em que a infecção por CFPHV provavelmente acontece. Como o tempo de permanência do vírus é baixa no ambiente, a hipótese mais provável é que este agente seja transmitido pelas lesões, por secreções ou através de vetores, mas as vias de reativação do agente não são conhecidas.

Como a qualidade do habitat destes animais é bastante variável, pode-se supor que as condições ambientais em que estes indivíduos se encontram possam comprometer a imunidade do hospedeiro, favorecendo o desenvolvimento de doenças. Outro aspecto relevante sobre a

relação do CFPHV com seu hospedeiro refere-se as migrações entre as áreas de reprodução e alimentação, podendo, desta forma, supor que agentes que estabeleçam latência também possam “migrar” entre estas áreas.

Considerando os aspectos apresentados e a ausência de informações sobre o envolvimento do sistema nervoso no mecanismo de latência de CFPHV, este trabalho tem como objetivos detectar a presença de CFPHV em tecido nervoso (cérebro) de *Chelonia mydas* e caracterizar as variantes virais presentes neste tecido, buscando possíveis relações geográficas entre as variantes virais, a migração entre as áreas de reprodução e alimentação e os mecanismos de latência que o herpesvírus possa estabelecer com seu hospedeiro.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Áreas de estudo e coleta de amostras.

Seis animais que vieram a óbito, provenientes do Espírito Santo, foram necropsiados em outubro de 2014. Para avaliar a presença de herpesvírus no sistema nervoso, foram coletadas amostras do tecido cerebral de cada indivíduo (Figura 4.1). O material cirúrgico utilizado foi esterilizado individualmente, em autoclave, e aberto apenas no momento da coleta. Também foram coletados fragmentos de pele e tumor de cada um destes animais. Todos os fragmentos de tecidos foram armazenados em microtubos com etanol 70% e mantidos refrigerados até serem encaminhados ao Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres (LAPCOM).

Figura 4.1 - Coleta de amostra de cérebro de *C. mydas* (ES, Outubro/2014). Fonte: PRIOSTE (2014).

Os seguintes dados biométricos foram levantados: Comprimento Curvilíneo da Carapaça (CCC), Largura Curvilínea da Carapaça (LCC) e Massa Corpórea (MC), e dados necroscópicos e relativos a condição corpórea e sanitária do animal foram anotados.

4.2.2 Processamento das amostras

Os tecidos colhidos foram armazenados em microtubos contendo etanol 70% e mantidos a -20°C até chegarem ao Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres (LAPCOM), localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde foram mantidos a -80°C até o processamento.

O processamento prévio das amostras para extração de DNA foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia (LABMAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os fragmentos de tecidos foram macerados e posteriormente submetidos a agitação em vórtex e a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido, a -80°C , e descongelamento a 56°C , sendo posteriormente clarificadas a

5000g durante 15 minutos, a 4°C, e uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi submetida ao protocolo de extração de DNA.

4.2.3 Extração de DNA

Em uma alíquota de 100 µL do sobrenadante de cada amostra foram adicionados 500 µL de solução de lise (SDS 1%; 100mM EDTA pH 8.0; 20 mM Tris-HCl pH 8.0; água Milli-Q) e 10 µL de Proteinase K. A solução foi homogeneizada em vórtex e incubada *overnight* a 37 °C em termobloco.

Após a incubação, foram adicionados 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio em cada microtubo, que foi posteriormente homogeneizado em vórtex, centrifugado por 10 minutos a 12000g, a 4°C, para a separação de fases. Uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi colocado em outro tubo e adicionou-se 500 µL de propanol. Esta solução permaneceu a - 20 °C por no mínimo 2 horas e, em seguida, centrifugada por 30 minutos a 12000g, a 4°C, para precipitação do pellet.

O sobrenadante foi descartado por inversão e cada pellet foi submetido a lavagem com 1 mL de etanol 70%. A amostra foi novamente centrifugada por 10 minutos e, em seguida o sobrenadante foi desprezada por inversão de tubo.

Cada pellet obtido deste procedimento foi submetido a secagem em termobloco a 56 °C, por 10 minutos, e o material obtido foi eluído em 30 µL de TE pH 8.0 (10mM Tris-HCl; 1 mM EDTA), incubado por 10 minutos a 56 °C e armazenado a - 20 °C até a realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR).

4.2.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Amostras de pele dos animais estudados foram coletadas e submetidas a análise do genótipo de mtDNA para caracterização dos haplótipos. Os *primers* utilizados e o tamanho dos fragmentos amplificados encontram-se na Tabela 4.1.

A amplificação foi realizada segundo o protocolo: 94°C a 2 min, seguido de 40 ciclos a 94°C (1 min), 57°C (1 min) e 72°C (1 min), e uma extensão final de 72°C a 10 min.

Tabela 4.1 – Sequência dos *primers* senso e anti-senso para região controle do DNA mitocondrial de *Chelonia mydas*

<i>Primers</i>	Gene-alvo	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do fragmento	Referência
LCM15382/H950	Região controle do DNA mitocondrial	F:GCTTAACCCTAAAGCATTGG R:GTCTCGGATTTAGGGGTTTG	~700pb	Abreu-Grobois et al., 2006

Para detecção dos genes da DNA polimerase e F-US3B de *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) foram utilizados os *primers* apresentados na Tabela 4.2, em que se encontra também a caracterização do gene alvo a ser amplificado.

Tabela 4.2 – Sequência de *primers* e caracterização dos genes-alvo para CFPHV.

<i>Primers</i>	Gene-alvo	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do fragmento	Referência
GTHV	DNA polimerase de CFPHV	F: GACACGCAGGCCAAAAAGCGA R: AGCATCATCCAGGCCACAA	~480pb	Quackenbush et al., 2001
F-US3B	Similar a uma serina/treonina quinase	F:TAGAGGTTTCGGCTTTGGCTG R:CGCCATTTCAGTTGCTCGAAG	~700pb	Este estudo

A amplificação de cada uma das sequências-alvo foi realizada conforme o seguinte protocolo: o gene da DNA polimerase de CFPHV conforme Rodenbusch et al., 2014 e o gene F-US3B com 94°C a 5 min, seguido de 35 ciclos a 95°C (1 min), 62°C (1 min) e 72°C (1 min), e uma extensão final de 72 °C a 10 min.

4.2.5 Leitura e análise dos produtos da PCR

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal (25 µL DNA amplificado acrescido de 2 µL de corante Gel Loading Buffer [Invitrogen Carlsbad, CA] em gel de agarose 2,0% (2,0 mg de Agarose Ultra-Pure [Invitrogen Carlsbad, CA]; 100 mL TBE 0,5X [44,58 M Tris-Base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA]) acrescido de tampão de corrida TBE 0,5X pH 8.0 à 110V/50mA. O gel foi corado com SYBR Safe DNA Gel Stain [Invitrogen Carlsbad, CA] e visualizado com luz ultravioleta (UV) em câmara escura

(Alphalmager). As amostras que revelaram bandas de DNA do tamanho do fragmento de cada gene e de acordo com o controle positivo, foram consideradas positivas para a reação de PCR utilizada.

4.2.6 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos

Os produtos da PCR foram recortados do gel de agarose e purificados utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification [GE Healthcare]. Após a purificação, os nucleotídeos foram submetidos ao sequenciamento utilizando o Kit BigDye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems/Austin, TX) de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático (Applied Biosystems/Perkin Elmer, modelo ABI Prism 310 Genetic, FosterCity, CA).

4.2.7 Análise das sequências

As sequências obtidas foram submetidas à análise qualitativa do eletroferograma pelo programa PHRED (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>) e apenas aquelas com valores superiores a 20 foram aceitas e analisadas utilizando os programas BioEdit 5.0.6 (HALL, 2001) e MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2011), alinhadas com Clustal W (THOMPSON et al., 2002), gerando um *contig* a partir das sequências senso e antisenso. Os *contigs* foram submetidos à análise de similaridade através do programa BLAST- Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL, 1990) para avaliar a homologia entre as sequências obtidas e àquelas disponíveis no GenBank.

4.2.8 Análise filogenética

As sequências dos genes estudados foram alinhadas com sequências similares disponíveis no GenBank. A árvore filogenética foi elaborada com o programa MEGA v.6.0 (TAMURA, 2011) utilizando o Método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-joining tree*), modelo de Jukes-Cantor e a confiabilidade dos ramos da árvore filogenética foi testada com 1000 repetições de *bootstrap*.

4.3 Resultados

4.3.1. Dados biométricos, observações macroscópicas e necroscópicas

Todos os indivíduos necropsiados apresentavam CCC entre 30 e 50 cm, indicativo de animais juvenis. Foram observados, do ponto de vista macroscópico, a condição corpórea, presença de tumores e epibiontes e sinais de interação com pesca. A tabela 4.3 apresenta a síntese destas observações para cada um dos indivíduos estudados, bem como um sugestivo de *causa mortis*, baseado nas observações macroscópicas e necroscópicas.

A tabela 4.4 contém uma síntese das observações necroscópicas e clínicas relativas a presença e aspecto de gorduras, para avaliar aspectos da sanidade do animal, alterações no cérebro e eventuais sinais clínicos em sistema nervoso.

Tabela 4.3 – Aspectos macroscópicos e sugestivo de *causa mortis* em tartarugas verdes necropsiadas no Espírito Santo.

Identificação	Condição corpórea	Tumores	Epibiontes	Interação com pesca	Sugestivo de <i>causa mortis</i>
ES-NECRO22	Média	Não	Sim	Sim	Indeterminado
ES-NECRO23	Boa	Não	Sim	Sim	Traumatismo por causa antrópica - choque hipovolêmico
ES-NECRO25	Ruim	Sim	Sim	Não	Indeterminado
ES-NECRO26	Média	Sim	Sim	Sim	Processo obstrutivo (fecaloma) – colapso tóxico endógeno
ES-NECRO29	Caquético	Sim	Sim	Não	Afogamento
ES-NECRO30	Boa	Não	Sim	Sim	Interação com pesca Colapso respiratório

Tabela 4.4 – Observações necroscópicas relativas ao acúmulo de gorduras, cérebro e eventuais sinais clínicos neurológicos.

Identificação	Observações necroscópicas e clínicas
ES-NECRO22	GORDURA - Escassa e com coloração enegrecida. CÉREBRO - Friável e com coloração pálida.
ES-NECRO23	GORDURA - Evidente e com coloração esverdeada. CÉREBRO - Friável e com coloração pálida.
ES-NECRO25	GORDURA - Escassa e com coloração enegrecida. CÉREBRO - Friável e com coloração pálida. Reflexos palpebrais baixos
ES-NECRO26	GORDURA - Escassa e com coloração enegrecida. CÉREBRO - Sem alterações aparentes.
ES-NECRO29	NÃO ANOTADA
ES-NECRO30	GORDURA - Evidente e apresentando coloração enegrecida. CÉREBRO - Congesto e friável.

Os haplótipos de cada um dos seis animais necropsiados foram determinados a partir das sequências curtas da região controle do DNA mitocondrial (mtDNA), com aproximadamente 400 pb, sendo confirmados a partir de matriz de identidade gerada no BioEdit. Foram caracterizados como animais positivos para a presença do CFPHV todo indivíduo que apresentou resultado positivo para os genes da DNA polimerase ou gene F-US3B, em qualquer um dos tecidos analisados. O gene F-US3B foi utilizado somente para diagnóstico da presença de herpesvírus, tendo em vista que há poucas informações no GenBank sobre este gene, em tartarugas-marinhas, e que estudo prévio demonstrou sequências de nucleotídeos bastante conservadas neste gene. A tabela 4.5 demonstra os resultados para haplótipo de *C. mydas* e presença de sequências de CFPHV por tecido. Anotou-se como AUSENTE para tumor quando a lesão não foi observada no indivíduo estudado. A figura 4.2 apresenta os produtos de amplificação da DNA polimerase nos cérebros dos animais estudados.

Tabela 4.5 – Caracterização do haplótipo de *C. mydas* a partir da análise de sequência do mtDNA e presença de CFPHV nos 6 animais necropsiados no Espírito Santo.

Identificação	Haplótipo de <i>C. mydas</i>	Presença de CFPHV		
		Cérebro	Pele	Tumor
ES-NECRO22	CM-A8	+	-	AUSENTE
ES-NECRO23	CM-A10	+	+	AUSENTE
ES-NECRO25	CM-A8	+	+	+
ES-NECRO26	CM-A8	+	+	+
ES-NECRO29	CM-A5	+	+	+
ES-NECRO30	CM-A8	-	+	AUSENTE

Figura 4.2 - Detecção dos produtos amplificados em cérebro de *C. mydas*, para a DNA polimerase de CFPHV (480 pb) em gel de agarose 2%. Lad - ladder 100 pb; C- (Controle Negativo), 1-ES-NECRO30; 2 a 6 – ES-NECRO 29, 26, 25, 23, 22, respectivamente; C+ (Controle Positivo)

Dos seis animais estudados, 4 (quatro) pertencem ao haplótipo CM-A8, sendo que dois destes animais possuíam tumores e apresentaram o herpesvírus em todos os tecidos analisados. O indivíduo pertencente ao haplótipo CM-A10 não apresentava tumores, mas foi detectado o vírus tanto no cérebro quanto na pele deste animal. O espécime de *C. mydas* pertencente ao haplótipo CM-A5 apresentava tumores e a presença de CFPHV foi detectada em todos os tecidos coletados deste animal.

Nos animais identificados como ES-NECRO25 e ES-NECRO26, ambos com fibropapilomatose e presença de herpesvírus em todos os tecidos analisados, foi possível notar presença de gordura escassa e condição corpórea de média a ruim. Do ponto de vista clínico, no animal ES-NECRO25, que encontrava-se em reabilitação e veio a óbito na base do TAMAR, foi possível detectar que este indivíduo apresentava reflexos palpebrais baixos. Durante a necropsia, verificou-se que o cérebro deste animal encontrava-se friável e apresentava coloração pálida.

4.3.2 Caracterização molecular de CFPHV

Todos os produtos amplificados para a DNA polimerase de CFPHV foram submetidos a sequenciamento pelo menos duas vezes. Isto porque a maioria dos eletroferogramas gerados apresentavam picos duplos em grande parte das regiões das sequências obtidas. Exceto para o animal identificado como ES-NECRO25, em todos os outros produtos amplificados não foi possível obter uma sequência capaz de ser completamente analisada. A análise dos eletroferogramas permitiu, no entanto, detectar sequências entre 80 a 160 pb com qualidade acima de 20 no PHRED. Estas sequências foram submetidas ao BLAST, sendo possível confirmar que pertencem ao CFPHV pois apresentaram identidade entre 92% e 94% com sequências depositadas provenientes do Brasil (São Paulo e Espírito Santo), Porto Rico, Golfo da Guiné, Hawai e Flórida. As características deste eletroferograma podem indicar que os animais estavam infectados por mais de uma variante viral, impedindo assim a caracterização da variante.

No indivíduo ES-NECRO25 foi possível detectar a mesma sequência no cérebro, pele e tumor. A árvore filogenética demonstrando as diferentes variantes foi construída no programa MEGA 6.0, a partir de fragmentos com 483 pb, referente à sequência parcial do gene da DNA polimerase, e comparada com outras sequências do mesmo gene que apresentaram alto grau de semelhança com as sequências obtidas neste estudo.

A figura 4.3 mostra as relações filogenéticas obtidas entre as sequências detectadas neste estudo, àquelas provenientes de um trabalho anterior no Brasil (RODENBUSCH et al., 2014) e em estudos realizados com animais dos Estados Unidos (Flórida), México, Hawai e Barbados.

Para avaliar a identidade entre as sequências identificadas neste estudo e àquelas obtidas no GenBank, foram analisados fragmentos de 460 pb, 473pb e 483pb do genoma parcial da

DNA polimerase do CFPHV, e uma matriz de identidade foi gerada no MEGA 6.0. Pode-se observar que, para fragmentos de 460pb e 473pb, a identidade foi de 100% com as sequências JN580279, JN580280, JN580281 e JN580282, provenientes de um estudo em Porto Rico e que apresenta elevada similaridade com sequência do Golfo da Guiné (PATRICIO et al., 2012). No entanto, esta sequência não havia sido observada em estudos anteriores no Brasil, podendo ser caracterizada como uma nova variante na costa brasileira.

O indivíduo estudado pertence ao CM-A8, que representa o haplótipo mais frequentemente encontrado nas áreas de alimentação do Brasil. Devido a maior proporção de indivíduos deste haplótipo na costa brasileira, deve-se considerar que existe uma maior probabilidade de infecção destes indivíduos, mas o efeito densidade-dependente deve ser avaliado utilizando um N amostral maior.

Figura 4.3 – Análise Filogenética de sequência de 483 pb da DNA polimerase de CFPHV detectada em pele, tumor e cérebro do indivíduo ES-NECRO25 de *Chelonia mydas* necropsiado em Vitória-ES. A árvore foi gerada pelo método de *Neighbour-joining*, modelo de Jukes-Cantor, com 1000 repetições de *bootstraps*. Em vermelho, a sequência obtida neste estudo. BR: Brasil; BRB: Barbados; FL: Flórida; HW: Hawaí; MX: México.

4.4 Discussão

4.4.1 Latência, coevolução e fibropapilomatose

Não foram encontrados dados na literatura que detectassem a presença do CFPHV em cérebro de tartarugas verdes, sendo este um achado inédito na literatura até o momento. Mas a importância desta observação, no entanto, está ligada ao ciclo biológico do herpesvírus. As discussões atuais sobre a manifestação da fibropapilomatose e sua relação com um alfa herpesvírus envolvem principalmente o mecanismo e o momento da infecção, mas não a manutenção do agente no indivíduo infectado.

Existe uma série de evidências que aponta para a infecção por CFPHV nas áreas de alimentação: uma maior densidade de indivíduos nestas áreas e a possibilidade de contato entre estes indivíduos e variantes regionais do herpesvírus comuns aos animais de cada uma destas áreas ou regiões (RODENBUSCH et al., 2014; ENE et al., 2005; HERBST et al., 2004; QUACKENBUSH et al., 1998). No entanto, a discussão sobre a latência do vírus surge recentemente (ALFARO-NUÑEZ et al., 2014) e pode ter implicações importantes na compreensão dos mecanismos de infecção e, principalmente, na manifestação clínica da fibropapilomatose e outras doenças associadas a herpesvírus em tartarugas marinhas.

A primeira implicação seria compreender porque alguns indivíduos de uma mesma área manifestam a doença, enquanto outros não. Para discutir este aspecto, deve-se inicialmente avaliar se o indivíduo encontra-se infectado pelo agente. Os dados apresentados neste trabalho demonstram que mesmo indivíduos que não apresentam a doença podem ser portadores do vírus, tanto no cérebro quanto na pele (Tabela 4.5).

Tendo sido constatado este aspecto, um novo questionamento surge: a capacidade de infecção e a virulência do parasita pode afetar o curso clínico da doença. Os resultados apresentados neste trabalho não permitem avaliar este aspecto, mas trabalhos recentes tem estudado o papel da modificação dos capsídeos virais e de glicoproteínas e apresentado modelos de como isto pode ocorrer (ALFARO-NUÑEZ et al., 2014). Esta hipótese não pode ser descartada, tendo em vista que em diversas regiões do globo a manifestação da fibropapilomatose pode ser bastante severa.

Um terceiro aspecto importante esta na relação entre o parasita e seu hospedeiro. Como os herpesvírus estabelecem relações de coevolução com seus hospedeiros, surge a seguinte hipótese: indivíduos de tartarugas marinhas com determinadas características genéticas podem

tomar contato com o agente, mas não manifestar a doença, enquanto outros indivíduos manifestam a patologia.

Os resultados detectados neste trabalho permitem elucidar parcialmente esta hipótese. Se considerarmos como marcadores moleculares a região do DNA mitocondrial que caracteriza os haplótipos de tartarugas verdes, poderíamos supor que alguns haplótipos pudessem apresentar resistência ou sensibilidade maior a infecção e manifestação da fibropapilomatose. A detecção de animais doentes em diferentes haplótipos permite inferir que este não seja um bom marcador molecular para avaliar esta sensibilidade ou resistência, pois foi possível observar que 2 animais pertencentes ao haplótipo CM-A8 possuíam fibropapilomatose, enquanto outros 2 indivíduos CM-A8 eram portadores do CFPHV mas não possuíam manifestação clínica da doença, pelo menos até a idade do óbito. Estudar um maior número de indivíduos afetados pela doença e relacionar com o mtDNA, no entanto, pode ser uma estratégia importante para avaliar o impacto que a doença tem na recomposição de indivíduos adultos reprodutivos.

O fato de encontrarmos, neste estudo, animais juvenis doentes ou portadores de CFPHV também deve ser melhor estudado. Se os animais juvenis tomam contato com o herpesvírus apenas quando chegam nas áreas de alimentação, é possível que este contato inicial com o agente possa resultar na manifestação clínica da doença. No entanto, a detecção do herpesvírus no cérebro ou na pele aponta que estes animais podem ser portadores saudáveis, como observado nos animais ES-NECRO22 e ES-NECRO30. Caso os indivíduos portadores atinjam a fase adulta, eles poderiam então transportar o agente por longas distâncias, como para as áreas de reprodução e ovoposição, e transmitir o agente verticalmente.

Apesar de a transmissão vertical do herpesvírus ainda não ter sido observada em tartarugas marinhas, devido ao pequeno número de pesquisas nesta área, esta hipótese não pode ser descartada, considerando que a transmissão de herpesvírus por secreções sexuais encontram-se bem caracterizadas para HHV-2, HHV-5 e HHV-7 em humanos.

A presença de CFPHV no cérebro de *C. mydas* também deve ser considerada como aspecto patológico a ser avaliado. Sequiera et al., 1979, em experimentos com roedores, detectaram a presença de HSV-1 após inoculação experimental e caracterizam os quadros neurológicos apresentados por estes animais. HSV-1, HSV-2 e VZV são herpesvírus que apresentam neurotropismo em adultos (NATHANSON, 2007) e *equid herpesvirus* são responsáveis por quadros de encefalite em cavalos (STRAUSS; STRAUSS, 2006). Os achados

necroscópicos no cérebro (friável e de coloração pálida) não podem ser diretamente relacionados aos achados moleculares de CFPHV neste tecido. Estudos histopatológicos e de microscopia eletrônica são ferramentas a serem aplicadas na detecção de corpúsculos de inclusão e partículas virais, seja na detecção da infecção latente, seja nos possíveis quadros clínicos causados pelos herpesvírus. Cabe também ressaltar que a sintomatologia nervosa apresentada pelo indivíduo ES-NECRO25, caracterizada pelos reflexos palpebrais baixos, bem como a *causa mortis* indeterminada deste indivíduo não excluem a possibilidade de ser este um dos quadros em SNC causado pelo herpesvírus.

4.4.2 Correlação entre as sequências de CFPHV, latência e dispersão viral

A análise das sequências de 460 pb, 473 pb e 483 pb da DNA polimerase do CFPHV provavelmente são as mesmas identificadas no capítulo 3. A árvore filogenética elaborada com sequências de 483 pb e apresentada na Figura 4.2 utilizou apenas sequências disponíveis no GenBank com mesmo número de pares de bases. A árvore filogenética gerada a partir de fragmentos com 460 pb apresentou a mesma topologia daquela apresentada no capítulo 3.

Da mesma forma que no capítulo 3, esta nova variante na costa brasileira apresenta 100% de identidade com as sequências de 473 pb obtidas por Patricio et al., 2012 e depositadas no GenBank como JN580279, JN580280, JN580281 e JN580282 e referentes a CFPHV detectados em Porto Rico (Figura 4.2).

Os achados deste estudo corroboram os discutidos anteriormente, e ainda demonstram que as variantes virais podem ser regionais, e não apenas locais. A elevada similaridade com sequências de DNA polimerase de Porto Rico e Golfo da Guiné reforçam a hipótese de que os vírus podem percorrer longas distâncias, e a detecção desta variante no cérebro podem indicar que este seja um dos tecidos em que o CFPHV estabelece sua fase latente.

Outro aspecto que deve ser considerado para a hipótese apresentada refere-se à posição do Golfo da Guiné e as correntes marítimas do Atlântico Sul. O Golfo da Guiné encontra-se na região centro-sul do Oceano Atlântico, próximo a origem da corrente marítima do Atlântico Sul, cujo fluxo ocorre de leste para oeste, se bifurcando no litoral do Nordeste do Brasil, formando a corrente do Brasil ao sul e percorrendo o litoral do Espírito Santo e de São Paulo, e a corrente Atlântica-Norte, que passa por Porto Rico. A presença do vírus em um animal do haplótipo CM-A8, cujas áreas de reprodução estão também no Atlântico Sul e que formam os

estoques mistos tanto de São Paulo, Espírito Santo e Porto Rico, é outra evidência que permite propor que o vírus pode circular entre estas áreas de alimentação e reprodução.

Como as substituições acontecem em uma taxa bastante elevada para herpesvírus, seria importante realizar estudos que determinem detectem estas substituições ao longo do tempo e nas áreas de alimentação.

Devido ao baixo tempo de permanência do vírus na água, a circulação do agente através do ambiente é menos provável.

Outro achado importante refere-se a análise dos eletroferogramas. O fato de as sequências apresentarem baixa capacidade de análise e uma série de picos duplos pode indicar mais de uma variante viral infectando o mesmo indivíduo.

4.5 Conclusões

A detecção de CFPHV no cérebro de 5 (cinco) espécimes de *Chelonia mydas* aponta para um possível tecido em que o vírus pode estabelecer sua latência ou ainda causar um quadro clínico, mas exceto para um indivíduo que apresentava reflexos palpebrais baixos, não foram observadas alterações clínicas que permitissem atribuir as observações macroscópicas e necroscópicas a este agente. A ausência de fibropapilomatose em dois indivíduos CFPHV positivos reforçam a possibilidade da latência.

A mesma sequência de nucleotídeos de um fragmento parcial da DNA polimerase, com 483 pb, foi identificada em pele, tumor e cérebro de um animal indicando a infecção por esta variante e sugerindo a reativação do agente. A matriz de identidade e a árvore filogenética apontam que a sequência detectada apresenta relação com sequências de DNA polimerase de CFPHV do Golfo da Guiné e de Porto Rico, e as correntes marítimas e os deslocamentos das tartarugas verdes das áreas de reprodução para as áreas de alimentação permite propor a dispersão do vírus por áreas distantes, através da latência em tecidos nervosos.

Os eletroferogramas também permitem inferir que um animal pode ser infectado por mais de uma variante viral, pois não foi possível obter sequências únicas em 5 dos animais estudados.

Referências

ALFARO-NUÑEZ, A.; BERTELSEN, M.F.; BOJESSEN, A.M.; RASMUSSEN, I.; ZEPEDA-MENDOZA, L.; OLSEN, M.T.; GILBERT, M.T.P. Global distribution of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus among clinically healthy sea turtles. **BMC Evolutionary Biology**, Denmark, v. 14, n.206, p.1471-2148, 2015.

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

AGUIRRE, A.A.; LUTZ, P.L. Marine turtles as sentinels of ecosystem health: is fibropapillomatosis an indicator? **EcoHealth**, New York, v.1, p. 275-283, 2005.

AGUIRRE, A.A.; BALAZS, G.H.; SPRAKER, T.R.; GROSS, T.S. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. **Physiological Zoology**, Chicago, v. 68, n. 5, p. 831-854, 1995.

AGUIRRE, A.A.; BALAZS, G.H.; ZIMMERMAN, B.; SPRAKER, T.R. Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 30, p. 8–15, 1995.

AGUIRRE, A.A.; O'HARA, T.M.; SPRAKER, T.R.; JESSUP, D.A. Monitoring the health and conservation of marine mammals and sea turtles and their ecosystems. In: AGUIRRE, A.A.; OSTFELD, R.S.; TABOR, G.M.; HOUSE, C.A.; PEARL, M.C. (Ed.). **Conservation medicine: ecological health in practice**. New York: Oxford University Press, 2002. p. 79–95.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v.215, p. 403-410, 1990.

BAPTISTOTTE, C. **Caracterização espacial e temporal da fibropapilomatose em tartarugas marinhas da costa brasileira**. 2007. 63p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

CHALOUPKA, M.; BALAZS, G.H.; WORK, T.M. Rise and fall over 26 years of a marine epizootic in Hawaiian green sea turtles. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 45, n. 4, p. 1138-1142, 2009.

CHALOUPKA, M.; LIMPUS, C.; MILLER, J. Green turtle somatic growth dynamics in a spatially disjunct Great Barrier Reef metapopulation. **Coral Reefs**, Berlin, v. 23, p. 325-335, 2005.

CHALOUPKA, M.; WORK, T.M.; BALAZS, G.H.; MURAKAWA, S.K.K.; MORRIS, R.A. Cause-specific temporal and spatial trends in green sea turtle strandings in the Hawaiian Archipelago (1982–2003). **Marine Biology**, Berlin, v. 154, p. 887–898, 2008a.

CHALOUPKA, M.; BJORNDAL, K.A.; BALAZS, G.H.; BOLTEN A.B.; EHRHART, L.M.; LIMPUS, C.J.; SUGANUMA, H.; TROËNG, S.; YAMAGUCHI, M. Encouraging outlook for recovery of a once severely exploited marine megaherbivore. **Global Ecology and Biogeography**, Oxford, v. 17, p. 297–304, 2008b.

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

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

GALLO, B.M.G.; MACEDO, S.; GIFFONI, B.B. de; BECKER, J.H.; BARATA, C.R. Sea turtle conservation in Ubatuba, Southeastern Brazil, a feeding area with incidental capture in Coastal Fisheries. **Chelonian Conservation and Biology**, Lunenburg, v. 5, n. 1, p. 93-101, 2006.

GREENBLATT, R.J.; QUACKENBUSH, S.L.; CASEY, R.N.; ROVNAK, J.; BALAZS, G.H.; WORK, T.M.; CASEY, J.W.; SUTTON, C.A. Genomic variation of the fibropapilloma-associated marine turtle herpesvirus across seven geographic areas and three host species. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 2, p. 1125-1132, 2005.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. **Nucleic Acids Symposium series**, London, v.41, p. 95-98, 2001.

HERBST, L.H. Fibropapillomatosis of marine turtles. **Annual Review of Fish Diseases**, Danvers, v. 4, p. 389-425, 1995.

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

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

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

LIMPUS, C.J.; MILLER, J.D. The occurrence of cutaneous fibropapillomas in marine turtles in Queensland. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 6, p. 70-78, 1995.

NARO-MACIEL, E.; BECKER, H.J.; LIMA, E.H.S.M.; MARCOVALDI, M.A.; DE SALLE, R. Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. **Journal of Heredity**, Washington, v. 97, p. 29-39, 2007.

QUACKENBUSCH, S.L.; CASEY, R.N.; MURCEK, R.J.; PAUL, T.A.; WORK, T.M.; LIMPUS, C.J.; CHAVES, A.; DUTOIT, L.; VASCONCELOS PERES, J.; AGUIRRE, A.A.; SPRAKER, R.T.; HORROCKS, J.A. VERMEER, L.A.; BALAZS, G.H.; CASEY, J.W. 2001. Quantitative analysis of herpesvirus sequences from normal tissue and fibropapillomas of marine turtles with real time PCR. **Virology**, New York, v. 287, p. 105-111, 2001.

RODENBUSCH, C.R.; BAPTISTOTTE, C.; WERNECK, M.R.; PIRES, T.T.; MELO, M.T.D.; ATAÍDE, M.W.; DOS REIS, K.D.H.L.; TESTA, P.; ALIEVE, M.M.; CANAL, C.W. Fibropapillomatosis in green turtles *Chelonia mydas* in Brasil: characteristics of tumors and virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v. 111, p. 207-217, 2015.

SINCLAIR, A.R.E.; NORTON-GRIFFITHS, M. **Serengeti: dynamics of an ecosystem**. Chicago: The University of Chicago Press, 1979. 389p.

STRAUSS, E.G.; STRAUSS, J.H. **Viruses and human disease**. 2.ed. Amsterdam: Elsevier, 2006. 461p.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

WORK, T.M.; DAGENAIS, J.; BALAZS, G.H.; SCHUMACHER, J.; LEWIS, T.D.; LEONG, J.C.; CASEY, R.N.; CASEY, J.W. *In vitro* biology of fibropapilloma-associated turtle herpesvirus and host cells in Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). **Journal of General Virology**, London, v. 90, p. 1943-1950, 2009.

5 PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) EM TARTARUGAS VERDES COM E SEM FIBROPAPILOMATOSE NA COSTA BRASILEIRA

Resumo

Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus (CFPHV) tem sido apontado como agente infeccioso primário da fibropapilomatose em tartarugas-marinhas, e a doença apresenta sua maior prevalência em tartarugas verdes (*Chelonia mydas*). Os herpesvírus também podem estabelecer infecções latentes, sem manifestação clínica da doença, mas estudos avaliando esta característica destes agentes são bastante recentes em tartarugas-marinhas. Neste trabalho foram coletadas amostras de pele e tumor de 136 indivíduos de *Chelonia mydas* provenientes de uma área mista – área de reprodução e alimentação (Fernando de Noronha-PE) e duas áreas de alimentação (Vitória-ES e Ubatuba-SP) para determinação da prevalência de CFPHV em indivíduos sadios e acometidos por fibropapilomatose, caracterização molecular do agente e compreensão de relações co-evolutivas entre variantes virais e origem reprodutiva de *C. mydas*, caracterizadas pelo mtDNA. A prevalência de CFPHV em indivíduos sadios foi de 9,56%, subindo para 45,58% ao se considerar também animais com fibropapilomatose. Não foi detectada a doença e a presença do agente em Fernando de Noronha-PE, enquanto as prevalências do vírus foram de 57,14% em Vitória-ES e 74,51% em Ubatuba-SP. A caracterização de sequências parciais da DNA polimerase de CFPHV permitiu a identificação de duas novas variantes virais na costa brasileira, sendo uma delas (Var.7) foi a variante predominante em Vitória-ES e Ubatuba-SP, enquanto que a Var. 8 foi encontrada somente em Vitória-ES. Não foi possível observar coevolução entre as variantes virais e os haplótipos de *C. mydas*, pois foi detectada infecção pela Var. 7 em indivíduos CM-A3, CM-A5, CM-A6, CM-A8 e CM-A9. Este resultado indica que a região controle do mtDNA não pode ser utilizada para avaliar relações co-evolutivas entre variantes virais e animais infectados. Também não foram encontradas variantes virais anteriormente identificadas em Vitória-ES e Ubatuba-SP, o que pode indicar que estas variantes foram substituídas por outras com maior infectividade. Também foi observada elevada similaridade entre as variantes identificadas neste trabalho e àquelas anteriormente encontradas no Brasil com sequências de CFPHV de Porto Rico e do Golfo da Guiné, sugerindo que indivíduos de *Chelonia mydas* que possuem a infecção latente podem carrear o agente entre áreas distantes. As elevadas taxas de mutação do CFPHV e a substituição de variantes detectadas neste estudo apontam para a necessidade de estudos ecológicos e epidemiológicos de longo prazo.

Palavras-chave: *Chelonia mydas*; CFPHV; Fibropapilomatose; Latência; mtDNA

Abstract

Fibropapilloma-associated herpesvirus Chelonid (CFPHV) has been indicated as the primary infectious agent of fibropapillomatosis in sea turtles, and the disease has a higher prevalence in green turtles (*Chelonia mydas*). The herpesvirus can also establish latent infections without clinical manifestation of the disease, but studies evaluating this feature of these agents are quite recent in sea turtles. In this study, skin and tumor samples of 136 individuals of *Chelonia mydas* were collected from a mixed area (Fernando de Noronha-PE) and two feeding areas (Vitória-ES and Ubatuba-SP) to determine the prevalence of CFPHV in both healthy individuals and the ones affected by fibropapillomatosis, molecular characterization of the agent and the understanding of co-evolutionary relationship between viral variants and reproductive origin of *C. mydas*, characterized by mtDNA. The prevalence of CFPHV in healthy subjects was 9.56%, rising to 45.58% when also considering animals with fibropapillomatosis. The disease and the presence of the agent in Fernando de Noronha-PE was not detected, whereas the prevalence of the virus was 57.14% in Vitória-ES and 74.51% in Ubatuba-SP. The characterization of partial sequences of DNA polymerase of CFPHV allowed the identification of two new viral variants on the coast of Brazil, one of which (Var.7) was the predominant variant in Vitoria ES-and Ubatuba-SP, while Var. 8 was found only in Vitória-ES. It was not possible to observe co-evolution of viral variants and haplotypes of *C. mydas*, because infection by Var. 7 was detected in CM-A3, CM-A5, CM-A6, CM-A8 and CM-A9 individuals. This result indicates that the mtDNA control region cannot be used to evaluate co-evolutionary relationships among virus variants and infected animals. We were unable to find viral previously identified variants in Vitoria-ES and Ubatuba-SP, which may indicate that these variants have been replaced by ones with more infectivity. It was also observed high similarity between the variants identified in this study and those previously found in Brazil with CFPHV sequences of Puerto Rico and the Gulf of Guinea, suggesting that *Chelonia mydas* individuals with latent infection may carry the agent among distant areas. The CFPHV high mutation rates and the replacement of variants detected in this study indicate the need for long-term ecological and epidemiological studies.

Keywords: *Chelonia mydas*; CFPHV; Fibropapillomatosis; Latency; mtDNA

5.1 Introdução

A fibropapilomatose foi detectada pela primeira vez em uma fêmea de *Chelonia mydas* mantida no Aquário de Nova Iorque em 1936. Este indivíduo era proveniente de Key West (Flórida, EUA) e a presença da doença em animais de vida livre desta região foram detectadas posteriormente (SMITH; COATES, 1938).

Nos anos seguintes, a doença foi detectada em *Lepidochelys olivacea*, *Dermochelys coriacea* e *Caretta caretta* em diversas áreas do mundo (RAIDAL; PRINCE, 1996; HIRAMA; EHRHART, 1999; AGUIRRE et al. 1994, 1998, 1999, 2000, 2002; HUERTA, 2000). No Brasil, o primeiro registro de fibropapilomatose ocorreu em 1986, no litoral do Espírito Santo, e os últimos dados de prevalência registrada para o litoral brasileiro aponta que 15,41% dos animais monitorados pelo projeto TAMAR/ICMBio apresentaram a doença entre 2000 e 2005, (BAPTISTOTTE, 2007).

O monitoramento da fibropapilomatose em diversas áreas do mundo tem demonstrado prevalências e comportamento bastante variados da doença (AGUIRRE; LUTZ, 2004; CHALOUPEK et al., 2009; LIMPUS; MILLER, 1994; COSTA, 2013). No Brasil, as maiores prevalências ocorrem no litoral do Ceará, Rio Grande do Norte e Espírito Santo, variando entre 36,94% e 27,43% nestas áreas, mas não há registros publicados da doença no Arquipélago de Fernando de Noronha e no Atol das Rocas (BAPTISTOTTE, 2007).

O curso clínico da doença normalmente envolve distúrbios de flutuação, caquexia, hipoproteïnemia, desbalanço eletrolítico, uremia e elevação de enzimas hepáticas, e o perfil hematológico pode apresentar diminuição progressiva de linfócitos, basófilos e eosinófilos, com aumento progressivo de heterófilos e monócitos, e podendo também ocorrer elevação nos níveis de proteínas plasmáticas (NORTON; JACOBSON; SUNDBERG, 1990; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997; WORK, BALAZS, 1999; ZWARG et al., 2006). Também há casos relatados de remissão espontânea dos tumores, aumento progressivo dos tumores e surgimento de novas formações (EHRHART; SINDLER, WITHERINGTON, 1986; JACOBSON et al., 1989; EHRHART, 1991; AGUIRRE et al., 1998).

Há evidências bastante fortes de que a doença tenha origem infecciosa, seja pelo surgimento da doença em novos locais, pela variação da doença e mesmo porque indivíduos acometidos podem se recuperar, além de trabalhos experimentais que demonstraram o

desenvolvimento da doença após inoculação de homogeneizados celulares de fibropapilomas (HERBST et al., 1995).

A detecção de sequências de DNA viral reforça estas evidências. Estas sequências tem sido amplamente estudadas, e a presença de um alfaherpesvírus nos tumores aponta este agente, denominado CFPHV (*Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus*) como fator primário da fibropapilomatose (QUACKENBUSH et al., 1998; YU et al., 2001; NIGRO et al., 2004; GREENBLATT et al., 2005; LACKOVICH et al., 1999; ENE et al., 2005; HERBST et al., 2008; WORK et al., 2009; HERBST; KLEIN, 1995).

Em se tratando de um herpesvírus, alguns aspectos biológicos deste agente também devem ser considerados no curso clínico da doença. Herpesvírus são capazes de estabelecer infecções latentes por um longo período de vida em seu hospedeiro e uma série de fatores, como estresse, exposição à radiação ultravioleta ou alteração das condições imunológicas do hospedeiro podem reativar a replicação do agente.

Em tartarugas verdes, principal espécie acometida pela doença, uma série de fatores ambientais parecem influenciar a reativação do vírus, como uso do solo e presença de poluentes (BALAZS, 1991; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997, HERBST; KLEIN, 1995; VAN HOUTAN et al., 2010).

Como a maior prevalência da doença ocorre em áreas de alimentação, aspectos da biologia de *Chelonia mydas* também devem ser considerados, particularmente a filopatria em relação às áreas de reprodução e a formação de estoques mistos, constituídos pela agregação de animais provenientes de diferentes áreas reprodutivas nas áreas de alimentação (BOWEN et al., 1992; BOLKER et al., 2003; NARO-MACIEL, 2007; RODEN et al., 2009; BLUMENTHAL et al., 2009).

Para determinar a origem reprodutiva dos animais presentes nas áreas de alimentação, tem-se utilizado a região controle do DNA mitocondrial (mtDNA) como marcador molecular, devido a distribuição geográfica dos agrupamentos de mtDNA e capacidade de fornecer informações sobre sua origem materna do indivíduo (LAHANAS et al., 1994; ENCALADA et al., 1996; BJORNDAL et al., 2005; 2006; NARO-MACIEL et al., 2009; 2012).

Como a literatura aponta que a infecção provavelmente ocorre nas áreas de alimentação e que a qualidade destes habitats possa influenciar a condição de sanidade do hospedeiro, estas áreas apresentam relevada importância para proteção ambiental, particularmente por

permitirem compreender a relação entre CFPHV e tartarugas marinhas, representarem locais em que há diversidade genética e estejam associadas a reposição de indivíduos adultos reprodutivos para as populações das espécies (CARRERAS et al., 2007)

Estudos sobre a presença do CFPHV e sua diversidade são recentes, mas estes trabalhos tem focado em caracterizar o vírus presentes nos tumores (ENE et al., 2005, RODENBUSCH et al., 2014). No entanto, a presença do agente tem sido apontada em tecidos epiteliais sem lesão (ALFARO-NUÑEZ et al., 2014) e buscado compreender a relação parasita-hospedeiro e sua associação com a latência do herpesvírus.

O presente estudo tem por objetivo avaliar a presença de CFPHV em animais com e sem fibropapilomatose em áreas mistas (área de reprodução e alimentação) e de alimentação da costa brasileira, caracterizar as variantes deste vírus nestas áreas e discutir as possíveis relações entre a composição do estoque misto nas áreas de alimentação, os fluxos migratórios de *Chelonia mydas* e variações genéticas do CFPHV nestas áreas.

5.2 Desenvolvimento

5.2.1 Áreas de estudo e coleta de dados.

Foram coletadas amostras de pele e tumor de tartarugas verdes provenientes de 3 localidades na costa brasileira: Ubatuba (SP). Vitória (ES) e Fernando de Noronha (PE). Os animais foram capturados no período de 2012 a 2014 e somente foram considerados animais vivos, recém-capturados e devolvidos à natureza após a colheita de amostras, refletindo a presença da estrutura do estoque misto de *C. mydas* e dos vírus presentes naquele

Os animais provenientes de Ubatuba (SP) foram capturados de forma incidental ou por resgate nos municípios de Ubatuba/SP, São Sebastião/SP e Angra dos Reis/RJ, sendo encaminhados ao Centro de Reabilitação do Projeto TAMAR/ICMBio, base de Ubatuba. A região caracteriza-se como área de alimentação de *C. mydas*, com alterações antrópicas em função do adensamento populacional ligado a moradias permanentes e população flutuante, tendo em vista o turismo na região (GALLO et al., 2006).

Em Vitória, no Espírito Santo, as capturas foram realizadas na Companhia Siderúrgica ArcelorMittal Tubarão, município de Serra, localizado a 10 km de Vitória (TORENZANI,

2010). O local de coleta encontra-se na saída de efluentes da companhia, sendo uma importante área de alimentação de tartarugas verdes no litoral capixaba.

Fernando de Noronha (PE) é uma ilha de origem vulcânica localizada a 345 km a oeste de Cabo São Roque/RN e a 545 km de Recife/PE. A ilha abriga duas Unidades de Conservação Federais: uma APA, criada em 1986, e um Parque Nacional Marinho, criado em 1988. É considerada área mista, por representar uma área de alimentação e reprodução de *Chelonia mydas*.

Dados biométricos de Comprimento Curvilíneo da Carapaça (CCC) e Largura Curvilínea da Carapaça (LCC) foram anotados, bem como a presença e ausência de tumores.

5.2.2 Coleta de amostras de pele e tumor

Os tecidos foram colhidos utilizando material cirúrgico estéril (*punch* ou bisturi) individualizado para cada animal e para cada fragmento de pele e tumor coletado. A região a ser coletada foi previamente higienizada com solução de iodopolvidine e fragmentos de até 0,5 cm foram retirados e armazenados em microtubos contendo solução de álcool 70% e mantidos a -20°C até chegarem ao Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres (LAPCOM), localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde foram mantidos a -80 °C até o processamento.

O processamento prévio das amostras para extração de DNA foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia (LABMAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os tubos foram submetidos a agitação em vórtex e a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido, a - 80 °C, e descongelamento a 56°C, sendo posteriormente clarificadas a 5000g durante 15 minutos, a 4°C, e uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi submetida ao protocolo de extração de DNA.

5.2.3 Extração de DNA

Em uma alíquota de 100 µL do sobrenadante de cada amostra foram adicionados 500 µL de solução de lise (SDS 1%; 100mM EDTA pH 8.0; 20 mM Tris-HCl pH 8.0; água Milli-

Q) e 10 μ L de Proteinase K. A solução foi homogeneizada em vórtex e incubada *overnight* a 37 °C em termobloco.

Após a incubação, foram adicionados 250 μ L de fenol e 250 μ L de clorofórmio em cada microtubo, que foi posteriormente homogeneizado em vórtex, centrifugado por 10 minutos a 12000g, a 4°C, para a separação de fases. Uma alíquota de 500 μ L do sobrenadante foi colocado em outro tubo e adicionou-se 500 μ L de propanol. Esta solução permaneceu a - 20 °C por no mínimo 2 horas e, em seguida, centrifugada por 30 minutos a 12000g, a 4°C, para precipitação do pellet.

O sobrenadante foi descartado por inversão e cada pellet foi submetido a lavagem com 1 mL de etanol 70%. A amostra foi novamente centrifugada por 10 minutos e, em seguida o sobrenadante foi desprezada por inversão de tubo.

Cada pellet obtido deste procedimento foi submetido a secagem em termobloco a 56 °C, por 10 minutos, e o material obtido foi eluído em 30 μ L de TE pH 8.0 (10mM Tris-HCl; 1 mM EDTA), incubado por 10 minutos a 56 °C e armazenado a - 20 °C até a realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR).

O DNA obtido foi quantificado em NanoDrop 2000C Spectrophotometer (Thermo Scientific) e somente amostras com mais de 0 μ g/ μ L foram submetidos a Reação de PCR.

5.2.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

As amostras de pele e tumor coletadas foram submetidas a análise do genótipo de mtDNA para caracterização dos haplótipos. Os *primers* utilizados e o tamanho dos fragmentos amplificados encontram-se na Tabela 5.1.

A amplificação foi realizada segundo o protocolo: 94°C a 2 min, seguido de 40 ciclos a 94°C (1 min), 57°C (1 min) e 72°C (1 min), e uma extensão final de 72°C a 10 min.

Tabela 5.1 – Sequência dos *primers* senso e anti-senso para região controle do DNA mitocondrial de *Chelonia mydas*

<i>Primers</i>	Gene-alvo	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do fragmento	Referência
<i>LCM15382</i> <i>/H950</i>	Região controle do DNA mitocondrial	F:GCTTAACCCTAAAGCATTGG R:GTCTCGGATTAGGGGTTTG	~700pb	Abreu-Grobois et al., 2006

Para a detecção dos genes da DNA polimerase e de quinase codificada pela região US3 do genoma de *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) foram utilizados os *primers* apresentados na Tabela 5.2, em que se encontra também a caracterização do gene alvo a ser amplificado.

Tabela 5.2 – Sequência de *primers* e caracterização dos genes-alvo para CFPHV.

<i>Primers</i>	Gene-alvo	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do fragmento	Referência
GTHV	DNA polimerase de CFPHV	F: GACACGCAGGCCAAAAAGCGA R: AGCATCATCCAGGCCACAA	~480pb	Quackenbush et al., 2001
F-US3B	Similar a uma serina/treonina quinase	F:TAGAGGTTTCGGCTTTGGCTG R:CGCCATTGCTGCTCGAAG	~700pb	Este estudo

A amplificação de cada uma das sequências-alvo foi realizada conforme o seguinte protocolo: o gene da DNA polimerase de CFPHV conforme Rodenbusch et al., 2014 e o gene da quinase da região US3 com 94°C a 5 min, seguido de 35 ciclos a 94°C (1 min), 62°C (1 min) e 72°C (1 min), e uma extensão final de 72 °C a 10 min.

5.2.5 Leitura e análise dos produtos da PCR

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal (25 µL DNA amplificado acrescido de 2 µL de corante Gel Loading Buffer [Invitrogen Carlsbad, CA] em gel de agarose 2,0% (2,0 mg de Agarose Ultra-Pure [Invitrogen Carlsbad, CA]; 100 mL TBE 0,5X [44,58 M Tris-Base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA]) acrescido de tampão de

corrida TBE 0,5X pH 8.0 à 110V/50mA. O gel foi corado com SYBR Safe DNA Gel Stain [Invitrogen Carlsbad, CA] e visualizado com luz ultravioleta (UV) em câmara escura (Alphalmager). As amostras que revelaram bandas de DNA do tamanho do fragmento de cada gene e de acordo com o controle positivo, foram consideradas positivas para a reação de PCR utilizada.

5.2.6 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos

Os produtos da PCR foram recortados do gel de agarose e purificados utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification [GE Healthcare]. Após a purificação, os nucleotídeos foram submetidos ao sequenciamento utilizando o Kit BigDye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems/Austin, TX) de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático (Applied Biosystems/Perkin Elmer, modelo ABI Prism 310 Genetic, FosterCity, CA).

5.2.7 Análise das sequências

As sequências obtidas foram submetidas à análise qualitativa do eletroferograma pelo programa PHRED (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>) e apenas aquelas com valores superiores a 20 foram aceitas e analisadas utilizando os programas BioEdit 5.0.6 (HALL, 2001) e MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2011), alinhadas com Clustal W (THOMPSON et al., 2002), gerando um *contig* a partir das sequências senso e antisenso. Os *contigs* foram submetidos à análise de similaridade através do programa BLAST- Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL, 1990) para avaliar a homologia entre as sequências obtidas e àquelas disponíveis no GenBank.

5.2.8 Análise filogenética

As sequências dos genes estudados foram alinhadas com sequências similares disponíveis no GenBank. A árvore filogenética foi elaborada com o programa MEGA v.6.0 (TAMURA, 2011) utilizando o Método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-joining tree*),

o modelo de Jukes-Cantor, e a confiabilidade dos ramos da árvore filogenética foi testada com 1000 repetições de *bootstrap*.

5.3 Resultados

5.3.1. Prevalência de CFPHV em animais com e sem fibropapilomatose

Foram estudados 136 animais provenientes de Fernando de Noronha-PE (43 indivíduos), Vitória-ES (42 indivíduos) e Ubatuba-SP (51 indivíduos). Estas áreas foram escolhidas por apresentarem prevalências zero, alta e intermediária, respectivamente, em estudo na costa brasileira, considerando o monitoramento do Projeto TAMAR/ICMBio realizado entre 2000 e 2005 e sintetizado por Baptistotte, 2007.

A tabela 5.3 apresenta os resultados obtidos neste estudo com relação à presença de fibropapilomatose e de CFPHV em animais com e sem fibropapilomatose. A prevalência de animais com fibropapilomatose foi de 52,38 % (22/42) em Vitória - ES e 52,9% (27/51) em Ubatuba - SP, e todos os animais provenientes de Fernando de Noronha-PE não apresentavam fibropapilomatose e foram negativos para CFPHV.

Foram detectados 24 animais com CFPHV em Vitória-ES, sendo que dois destes indivíduos não apresentavam tumores. Em Ubatuba-SP, 11 indivíduos sem fibropapilomatose foram positivos para CFPHV e em 38 dos 51 animais (74,51%) estudados desta área foi detectada a presença do vírus.

No total, foi detectada a presença de 62 animais positivos para CFPHV (45,58%), sendo a maior prevalência de fibropapilomatose e de CFPHV detectada em animais provenientes de Ubatuba-SP (74,51%).

Tabela 5.3 - Síntese dos resultados de presença de fibropapilomatose e detecção de CFPHV nos animais estudados no período entre 2012 e 2014.

Área de estudo	Número de indivíduos analisados	Resultados para PCR para CFPHV por tipo de tecido			Total de animais positivos para CFPHV	% de animais positivos para CFPHV
		FP	Pele + FP	Sem FP		
Fernando de Noronha – PE	43	0	0	0	0	0
Vitória - ES	42	22	4	2	24	57,14
Ubatuba - SP	51	27	10	11	38	74,51
TOTAL	136	50	19	13	62	45,58

A tabela 5.4 apresenta os resultados relativos a presença de CFPHV entre os haplótipos de *C. mydas* sequenciados. Foram obtidas sequências de mtDNA de 25 animais provenientes de Vitória-ES e de 28 animais de Ubatuba-SP. O haplótipo CM-A8 foi o mais comum em ambas as localidades, e tem sido o haplótipo mais frequentemente observado na região Sudeste do Brasil (NARO-MACIEL et al., 2007; JORDÃO, 2013). Também foram detectados animais pertencentes aos haplótipos CM-A3, CM-A5, CM-A6 e CM-A9, em Ubatuba-SP, e o haplótipo CM-A5 em Vitória-ES. A presença de CFPHV foi observada em todos os animais dos haplótipos CM-A3, CM-A5 e CM-A9, em Ubatuba-SP, e em 3 (três) dos cinco indivíduos pertencentes ao haplótipo CM-A5 de Vitória – ES. Os haplótipos de Fernando de Noronha-PE não foram caracterizados porque não foram identificados animais positivos para CFPHV nesta área.

Tabela 5.4 - Caracterização dos haplótipos de *C. mydas* em Vitória – ES e Ubatuba – SP e número de indivíduos infectados por CFPHV, de acordo com o haplótipo e o local de coleta

Haplótipo	Vitória - Espírito Santo		Ubatuba – São Paulo	
	Número de Indivíduos	Positivos para CFPHV	Número de Indivíduos	Positivos para CFPHV
CM-A3	0	0	1	1
CM-A5	5	3	4	4
CM-A6	0	0	1	0
CM-A8	20	11	20	17
CM-A9	0	0	2	2
TOTAL	25	14	28	24

5.3.2 Caracterização molecular de CFPHV

Todos os produtos amplificados para a DNA polimerase de CFPHV foram submetidos a sequenciamento pelo menos duas vezes. Foram analisadas 23 sequências do herpesvírus, pertencentes a 18 animais de Ubatuba-SP. Em cinco indivíduos de Ubatuba-SP, positivos para CFPHV em pele e tumor, foi selecionada uma sequência de cada tecido, para avaliar se a mesma variante viral estava presente em ambos os tecidos do mesmo animal.

Também foram analisadas 10 sequências da DNA polimerase de CFPHV detectadas em 8 animais de Vitória-ES. Dois animais foram positivos para CFPHV em pele e tumor, e uma sequência de cada um destes tecidos foi avaliada para caracterização do herpesvírus.

A figura 5.1 apresenta as relações filogenéticas obtidas entre as sequências detectadas neste estudo, àquelas provenientes de um trabalho anterior no Brasil (RODENBUSCH et al., 2014) e em estudos realizados com animais dos Estados Unidos (Flórida), México, Hawai e Barbados.

Para avaliar a identidade entre as sequências identificadas neste estudo e àquelas obtidas no GenBank, foram analisados fragmentos de 483pb do genoma parcial da DNA polimerase do CFPHV, e uma matriz de identidade foi gerada no MEGA 6.0.

Todas as sequências (23) de CFPHV dos animais de Ubatuba-SP foram idênticas e pertencem a uma mesma variante, anteriormente não detectada no Brasil, e que foi provisoriamente nomeada como BR-VAR.7. Esta variante também esteve presente em 8 animais provenientes de Vitória-ES. No total, 24 animais encontravam-se infectados pela BR-VAR.7. Também foi identificada uma outra variante no Espírito Santo, que não havia sido identificada anteriormente na costa brasileira e provisoriamente chamada de BR-VAR.8. Ambas as variantes obtidas neste estudo possuem maior similaridade com àquelas identificadas em Porto Rico e com sequências do Golfo da Guiné (PATRICIO et al., 2012), que não foi utilizada para a elaboração da árvore filogenética por apresentar menos de 473 pb.

Figura 5.1 – Análise Filogenética de sequência de 473 pb da DNA polimerase de CFPHV de pele, tumor e cérebro detectada em um indivíduo de *Chelonia mydas* necropsiado em Vitória-ES. A árvore foi gerada pelo método de *Neighbour-joining*, modelo de Jukes-Cantor, com 1000 repetições de *bootstraps*. Em vermelho, as sequências obtidas neste estudo. AUS: Austrália; BR: Brasil; BRB: Barbados; FL: Flórida; HW: Hawaí; MX: México

5.4 Discussão

5.4.1 Prevalência e Caracterização Molecular de CFPHV

A prevalência global de CFPHV foi recentemente publicada por Alfaro-Núñez et al., 2014, sendo que 29,4% dos indivíduos analisados naquele trabalho foram positivas para a presença do vírus. No entanto, a costa brasileira não havia sido representada, e este estudo vem contemplar parcialmente o conhecimento sobre a presença do vírus no Oceano Atlântico.

Comparando os dados apresentados por Alfaro-Núñez et al., é possível observar que a prevalência de CFPHV em *Chelonia mydas* em animais sem fibropapilomatose foi de 9,56% (13/136) nas amostras utilizadas neste estudo, enquanto naquele, considerando amostras provenientes do Caribe, Atlântico Leste e Golfo Árabe, observou-se que 11,54% (24/208) de animais sem presença de fibropapilomatose podem manter o vírus em latência no tecido epitelial.

No entanto, a prevalência de CFPHV observada neste estudo é bastante superior àquela observada globalmente em *Chelonia mydas*, e provavelmente reflete especificidades regionais. Naquele estudo, animais provenientes de Porto Rico, Golfo Árabe e Norte do Oceano Índico não apresentaram fibropapilomatose e nem foi detectado o CFPHV. Neste estudo, o Arquipélago de Fernando de Noronha também pode ser caracterizado como área em que o herpesvírus não se encontra presente nos tecidos do animal, tendo em vista que não há relatos de ocorrência da doença e que este estudo é o primeiro a avaliar a prevalência de CFPHV naquela área.

A elevada prevalência de CFPHV e fibropapilomatose em Vitória-ES e Ubatuba-SP reforça a idéia de que, nestas áreas, possa ocorrer a transmissão do agente e a manifestação clínica da doença. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho não permitem concluir se a manifestação da fibropapilomatose se deve a patogenicidade das variantes virais ou a qualidade ambiental destas áreas de alimentação.

Mas um aspecto relevante observado pelos nossos resultados pode indicar que a capacidade de causar infecção e manifestação clínica da doença pode estar ligada a características do CFPHV. A presença de 31 sequências pertencentes a BR-VAR.7, infectando a maioria dos animais utilizados neste estudo, pode indicar que esta variante apresenta uma maior capacidade infecciosa que outras variantes, justificando assim sua prevalência em

animais sadios e acometidos pela doença, tanto no litoral do Espírito Santo quanto em São Paulo.

A tabela 5.5 apresenta uma síntese comparativa de trabalhos publicados caracterizando as principais variantes de CFPBV detectadas em cada um destes estudos e representadas na tabela pelo número absoluto da variante detectada em relação ao número de indivíduos estudados.

Tabela 5.5 - Detecção e quantificação de variantes de CFPBV detectadas em tartarugas marinhas em diferentes áreas e períodos de estudo. SP: São Paulo; ES: Espírito Santo; BA: Bahia; CE: Ceará

Variante	Localidade	ENE et al., 2005	RODENBUSCH et al., 2014	Este estudo
Var. A	Flórida-EUA	28/49	ND	ND
Var. B	Flórida-EUA	16/49	ND	ND
Var. 1	SP	ND	2/29	ND
Var. 2	SP	ND	1/29	ND
Var. 3	ES	ND	2/29	ND
Var. 4	SP, ES, BA, CE	ND	17/29	ND
Var. 5	BA	ND	1/29	ND
Var. 6	CE	ND	6/29	ND
Var. 4	SP, ES, BA, CE	ND	17/29	ND
Var. 7	SP, ES	ND	ND	24/26
Var. 8	ES	ND	ND	2/26

A análise da tabela 5.5 permite observar que existem variantes específicas em cada uma das áreas: as variantes A e B, foram identificadas somente na Flórida, e não se encontram representadas na costa brasileira. Já as variantes 1, 2 e 4 foram observadas em 3 estados diferentes, e a variante 4 apresentou uma elevada prevalência entre os indivíduos de *Chelonia mydas* estudados no litoral brasileiro no período de 2009 a 2011, enquanto a variante 6 foi detectada em todos os animais provenientes do Ceará.

Esta prevalência de uma determinada variante também foi observada neste estudo, sendo a Var. 7 àquela que infecta um maior número de indivíduos em Vitória – ES e Ubatuba - SP. Um resultado importante, detectado neste trabalho, foi que as variantes encontradas no Espírito Santo e em São Paulo, entre 2009 e 2011 não foram encontradas neste estudo.

Esta ausência das variantes identificadas anteriormente em São Paulo e Espírito Santo, e a detecção de novas variantes, nos permite propor algumas hipóteses sobre a dinâmica do vírus e sua relação com as tartarugas verdes presentes nestas áreas de alimentação.

A primeira hipótese pode indicar que houve alguma substituição de nucleotídeos de uma das variantes identificadas em SP (variantes 1, 2 e 4) e ES (variantes 3 e 4) que deu origem as variantes Var. 7 (SP e ES) e Var. 8 (ES) observadas neste estudo. Considerando que as amostras analisadas por Rodenbusch et al., 2014 foram coletadas entre 2009 e 2011, e que este estudo apresenta a caracterização e ocorrência de CFPHV de animais coletados entre 2012 e 2014, esta hipótese poderia ser explicada avaliando-se a taxa de substituição de nucleotídeos que ocorre no gene da DNA polimerase do CFPHV.

Apesar da elevada taxa de substituição apresentada por Patrício et al., 2012 para o gene da DNA polimerase de CFPHV, entre $1,90 \cdot 10^{-4}$ e $8,47 \cdot 10^{-4}$ substituições por *locus* por ano, mudanças nesta sequência, em um período de tempo relativamente curto, somente seriam esperadas se este gene apresentasse uma taxa mais rápida de substituições. Como o vírus está sujeito a diversas pressões de seleção nas áreas de alimentação, somente o monitoramento constante do CFPHV nestas áreas pode permitir compreender se os resultados observados refletem uma elevada taxa de substituição por *locus* por ano.

Outra hipótese pode estar ligada a chegada recente das variantes 7 e 8 nas áreas de alimentação estudadas. Como a topologia da árvore filogenética para a DNA polimerase demonstra a elevada similaridade entre as sequências identificadas neste estudo e àquelas descritas por Rodenbusch et al., 2014, Patrício et al., 2012 e provenientes do Golfo da Guiné, é possível que esta nova variante tenha chegado recentemente a costa brasileira. Alguns pontos que reforçam esta hipótese estão ligados às correntes marítimas do Atlântico Sul e do Brasil, utilizadas pelas tartarugas verdes para migrarem entre as áreas de reprodução do Atlântico Sul até o sudeste brasileiro. A presença do haplótipo CM-A8, proveniente principalmente de ilhas oceânicas no Atlântico Sul, como Ascensão, também reforça esta hipótese, pois estes indivíduos utilizam as correntes marítimas do Atlântico Sul para chegarem até o Brasil. A proximidade entre a ilha de Ascensão e o Golfo da Guiné, cujas sequências de CFPHV foram identificadas, e a presença da infecção latente, em cérebro (capítulo 4) e pele, são evidência que apontam que o CFPHV pode migrar com seu hospedeiro entre áreas geograficamente distantes.

Do ponto de vista epidemiológico, a prevalência da Var. 7 pode indicar um surto de infecção por esta variante. Considerando os capítulos 3 e 4, em que foram detectadas a mesma

variante (Var. 7) em secreções, cérebro, pele e tumor, e as elevadas prevalências observadas de CFPHV e fibropapilomatose detectadas neste estudo, é possível que esta seja a principal variante relacionada aos quadros de fibropapilomatose nas áreas estudadas. Outro aspecto que deve ser considerado para a caracterização de um possível surto é o fato da literatura científica considerar que a infecção de tartarugas verdes por CFPHV ocorra nas áreas de alimentação. Como todos os indivíduos estudados são juvenis, apresentando CCC entre 30 e 80 cm, este possível primeiro contato com a nova variante pode ser responsável pela infecção e desenvolvimento da doença. No entanto, não se pode descartar que as condições ambientais de Ubatuba-SP e Vitória-ES possam comprometer a imunidade de hospedeiro previamente infectado, favorecendo o curso clínico da fibropapilomatose.

5.4.2 Proposta de modelo da transmissão e persistência do CFPHV em *Chelonia mydas*

Enquanto a epidemiologia de diversas doenças causadas por microparasitas tem suas dinâmicas bem conhecidas em humanos e animais domesticados, a variabilidade demográfica do hospedeiro e a estrutura social de cada espécie em vida livre trazem novos elementos para compreender a ecologia das doenças (SWINTON et al., 2002). A presença e o sucesso de um parasita estão relacionados à dinâmica da população de hospedeiros, que é um dos objetos centrais nos estudos de ecologia de doenças (TOMPKINS et al., 2002).

Desta forma, devem ser consideradas as relações ecológicas estabelecidas entre o parasita e seu hospedeiro. Para a ecologia, é importante detectar o número de hospedeiros infectados como parâmetro para avaliar o estudo de uma epidemia. Os habitats dos parasitos são vivos, podem responder ativamente à presença de um parasita, através de respostas imunológicas, mudando sua natureza (BEGON et al., 2007).

A partir dos aspectos ecológicos apontados, pode-se propor um modelo que explique, como o CFPHV se mantém nas aglomerações de *Chelonia mydas* nas duas áreas de alimentação estudadas – Ubatuba-SP e Vitória-ES.

Considere que animais juvenis que chegam nestas duas áreas de alimentação sejam susceptíveis a infecção por CFPHV. Estes indivíduos são chamados de SUSCEPTÍVEIS e, se ocorrer a infecção, passam a ser classificados como INFECTADOS. Ao serem infectados, seja previamente à chegada nas áreas de alimentação ou assim que chegam nestas áreas, podem

desenvolver ou não a fibropapilomatose. Ao desenvolverem a doença, duas alternativas são previstas: estes indivíduos morrem e deixam de fazer parte da metapopulação de *Chelonia mydas* de uma determinada área de alimentação, ou podem se recuperar, sendo então classificados como RECUPERADOS. Ao se recuperarem, é possível supor que adquiram imunidade àquele parasita. Se considerarmos que animais juvenis (com CCC entre 30 e 80 centímetros) apresentam maior prevalência de CFPHV e fibropapilomatose em relação a indivíduos adultos, este modelo ecológico é bastante útil para explicar a doença e está de acordo com o modelo SIR (*SUSCEPTIBLE-INFECTED-RECOVERED model*) descrito por Swinton et al., 2002.

Do ponto de vista do CFPHV, os indivíduos de *C. mydas* são `habitats` a serem ocupados. Para o parasita se manter ao longo do tempo, é necessário que a proporção de indivíduos INFECTADOS seja maior que o número de indivíduos SUSCEPTÍVEIS durante o período de infecção, permitindo assim a manutenção do parasita naquele momento. O número de indivíduos e o contato entre SUSCEPTÍVEIS e INFECTADOS na área também é importante para a manutenção do CFPHV. Assim, apesar do número reduzido de indivíduos de diferentes haplótipos de *C. mydas*, que não permitiu análises estatísticas de prevalência da doença entre animais provindos de diferentes áreas reprodutivas, é possível propor que o haplótipo CM-A8 seja o que apresenta maior número de INFECTADOS e SUSCEPTÍVEIS, em função da sua maior contribuição na composição dos estoques mistos destas áreas de alimentação.

As elevadas prevalências observadas da VAR.7 de CFPHV nas duas áreas de alimentação e a presença do vírus e desta variante nas secreções, no período entre 2012 e 2014, podem indicar a manutenção da VAR.7 nestes estoques. Para explicar a presença das novas variantes detectadas e, principalmente, a prevalência da VAR.7, duas hipóteses podem ser propostas:

- Houve redução na proporção de indivíduos INFECTADOS em relação aos SUSCEPTÍVEIS em anos anteriores e relacionada a outras variantes, que pode ter gerado uma condição de não permanência do parasita. Neste caso, o surgimento da VAR.7, por substituição de nucleotídeos em alguma das variantes detectadas anteriormente nas áreas estudadas, pode estar ligada a alta prevalência de infecção por CFPHV observada entre 2012-2014, principalmente pela VAR.7, nos animais amostrados;

- A chegada de uma nova variante proveniente de outra região pode ter levado a um aumento da proporção de INFECTADOS por esta variante em relação ao número de SUSCEPTÍVEIS, resultando em uma maior prevalência de CFPHV e da fibropapilomatose.

Outras hipóteses podem ser propostas, agora do ponto de vista do hospedeiro. Dois casos interessantes podem ser usados para exemplificar esta resposta do hospedeiro.

RICKLEFS, 2003 descreve o caso da introdução de coelhos europeus na Austrália, que rapidamente tornaram-se praga naquele país. O controle deste animal foi realizado a partir da introdução do vírus do mixoma (câncer fibroso letal para coelhos europeus), mas as populações destes animais responderam rapidamente a doença, a partir da seleção de hospedeiros resistentes, e a população de coelho, que havia sido reduzida em 90% nos primeiros anos da introdução do patógeno, aumentou novamente.

O segundo exemplo vem da infecção de mariposas (*Lymantria dispar*) por um baculovírus causador da poliedrose, que resulta na dissolução dos tecidos do animal infectado e aumento das partículas virais neste fluido. Neste caso, houve redução da transmissão mesmo com o aumento do tamanho da população de mariposas e da densidade do número de organismos infectados (D'AMICO et al., 1996). Modelos matemáticos permitiram entender que o aumento de indivíduos menos susceptíveis a doença pode ter levado a esta redução da infecção ao longo do tempo (DWYER et al., 1997)

A partir dos casos apresentados, pode-se propor, de acordo com o modelo SIR (*SUSCEPTIBLE-INFECTED-RECOVERED model*), que os estoques mistos das áreas de alimentação podem sofrer mudanças em relação ao número de indivíduos SUSCEPTÍVEIS e, portanto, reduzir também o número de INFECTADOS. Novamente, se a proporção de INFECTADOS for menor que a de SUSCEPTÍVEIS, o vírus pode não se manter, exceto se ocorrer a entrada de uma nova variante viral ou houver seleção de variantes virais diferentes daquelas que existiam previamente nestas áreas de alimentação. Assim, é possível propor que animais que não haviam tomado contato com as novas variantes façam parte dos indivíduos SUSCEPTÍVEIS inicialmente, e, após contato com o agente, se tornem INFECTADOS, aumentando a proporção destes nas agregações de tartarugas verdes e permitindo a manutenção do agente nestas áreas de alimentação. Neste caso, apesar do haplótipo CM-A8 não ter se mostrado um bom modelo para indicar coevolução, o monitoramento da prevalência de CFPHV

e de fibropapilomatose nos indivíduos caracterizados por este genoma matriarcal pode ajudar a elucidar o surgimento de indivíduos não SUSCEPTÍVEIS e auxiliar na compreensão da relação parasita-hospedeiro estabelecida em áreas de alimentação.

Portanto, pode-se supor que as variantes recém-detectadas neste estudo reflitam a mudança da natureza do herpesvírus ou da estrutura do estoque misto. Como os animais permanecem por longo tempo nas áreas de alimentação, e indivíduos chegam a maturidade após os 25 anos de idade, ao mesmo tempo que o vírus apresenta uma alta taxa de substituição de nucleotídeos, é mais provável que as variantes do vírus reflitam um processo de seleção do parasita para aumentar o número de INFECTADOS. Também é possível propor que como o herpesvírus é capaz de causar a infecção latente, e, portanto, móvel devido a biologia de seu hospedeiro, a detecção de uma determinada variante de um patógeno, em uma área ampla, pode refletir os padrões de movimento do seu hospedeiro e caracterizar o mecanismo de dispersão deste patógeno.

É menos provável que a substituição do mesmo nucleotídeo tenha ocorrido em ambas as áreas em um período tão curto de tempo (entre 1 e 5 anos, considerando que a VAR. 7 foi observada em animais coletados entre 2012 e 2014), contribuindo para reforçar a hipótese de que os deslocamentos realizados por indivíduos de *Chelonia mydas* entre diferentes áreas possa refletir no padrão de dispersão do CFPHV e de suas variantes.

Apesar da menor probabilidade desta substituição ter ocorrido, somente estudos de longo período podem ajudar a compreender a manutenção desta variante ao longo do tempo e sua relação com a prevalência da fibropapilomatose.

Cabe propor que as substituições identificadas entre as variantes de herpesvírus reflitam um processo de seleção e adaptação do parasita ao seu hospedeiro e que, para a relação CFPHV-*Chelonia mydas* estabelecida nas áreas de alimentação, as variantes do herpesvírus e sua predominância indiquem que uma “população” deste parasita foi estabelecida em uma metapopulação de tartarugas verdes destas áreas de alimentação, considerando que diferentes haplótipos de *C. mydas* compõem estes estoques mistos. As substituições de nucleotídeos observadas na VAR. 7, em relação as variantes 1,2 e 4 detectadas entre 2009 e 2011, podem refletir este processo de adaptação do parasita perante seu hospedeiro.

Outra hipótese plausível é que esta nova variante apresente maior capacidade de causar infecção em relação as anteriormente detectadas. A sequência da DNA polimerase estudada não permite afirmar isto, pois a invasão e infecção do patógeno dependem principalmente de

glicoproteínas do envelope e do capsídeo. Mas a prevalência elevada da VAR.7 é um forte indício desta maior capacidade de causar infecção.

Os resultados obtidos apontam para a necessidade de estudos ecológicos e epidemiológicos de longo prazo no monitoramento não somente dos quadros clínicos de doenças infecciosas em animais de vida livre, mas também em relação à variabilidade do vírus e do número de indivíduos infectados que não apresentem manifestação clínica da doença. Estes levantamentos podem contribuir para corroborar o modelo ecológico apresentado e compreender como a latência, adaptação e dispersão atuam na manutenção e variabilidade do patógeno, particularmente nas áreas de alimentação, que constituem importantes repositórios de indivíduos reprodutivos de *Chelonia mydas*.

5.5 Conclusões

Foi possível observar, nas amostras estudadas, uma prevalência de 9,56% de animais sadios portadores de CFPHV no tecido epitelial, comprovando que o vírus estudado pode estabelecer infecção latente. A prevalência de CFPHV, considerando animais sadios e doentes, foi de 45,58%, sendo um indicativo regional entre Ubatuba-SP e Vitória-ES, pois não foram identificados animais positivos para o agente em Fernando de Noronha-PE.

A maior presença do haplótipo CM-A8 em Ubatuba-SP e Vitória-ES é compatível com os resultados apresentados anteriormente na literatura, comprovando a maior contribuição deste haplótipo na estrutura dos estoques mistos destas áreas de alimentação. No entanto, não foi possível determinar especificidade entre as variantes virais detectadas e este haplótipo, pois indivíduos pertencentes aos haplótipos CM-A3, CM-A5 e CM-A9 também encontravam-se infectados pela mesma variante viral. Estes resultados apontam que a região controle do mtDNA não é um bom marcador para detectar coevolução entre o vírus e seu hospedeiro.

Também foram identificadas duas novas variantes de CFPHV no sudeste do Brasil, chamadas de Var. 7 e Var. 8. A variante viral Var. 7 foi predominante tanto em Vitória-ES quanto em Ubatuba-SP e a Var.8 somente foi identificada em Ubatuba-SP. A elevada prevalência desta variante indica sua relação com os casos de fibropapilomatose observados entre 2012 e 2014, sendo possível propor um surto da doença causada por esta variante. Outro

fato importante foi a não detecção de variantes de CFPHV descritas anteriormente para as áreas estudadas e a elevada similaridade das Var. 7 e Var. 8 com sequências de Porto Rico e Golfo da Guiné, que, associadas à latência, podem indicar fluxo do patógeno entre áreas mais distantes e propor que pressões de seleção ocorram nas áreas de alimentação, permitindo a manutenção de determinadas variantes virais locais ou regionais nos estoques mistos de *Chelonia mydas* presentes na costa brasileira.

Referências

ALFARO-NUÑEZ, A.; BERTELSEN, M.F.; BOJESSEN, A.M.; RASMUSSEN, I.; ZEPEDA-MENDOZA, L.; OLSEN, M.T.; GILBERT, M.T.P. Global distribution of *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* among clinically healthy sea turtles. **BMC Evolutionary Biology**, Denmark, v. 14, n.206, p.1471-2148, 2016.

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

AGUIRRE, A.A.; O'HARA, T.M.; SPRAKER, T.R.; JESSUP, D.A. Monitoring the health and conservation of marine mammals and sea turtles and their ecosystems. In: AGUIRRE, A.A.; OSTFELD, R.S.; TABOR, G.M.; HOUSE, C.A.; PEARL, M.C. (Ed.). **Conservation medicine: ecological health in practice**. New York: Oxford University Press, 2002. p. 79–96.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v.215, p. 403-410, 1990.

BAPTISTOTTE, C. **Caracterização espacial e temporal da fibropapilomatose em tartarugas marinhas da costa brasileira**. 2007. 63p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BEGON, M.; TOWNSEND, C.R.; HARPER, J.L. *Ecologia – De indivíduos a ecossistemas*. Porto Alegre: Artmed, 2007. 740p.

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

CHALOUPKA, M.; BALAZS, G.H.; WORK, T.M. Rise and fall over 26 years of a marine epizootic in Hawaiian green sea turtles. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 45, n. 4, p. 1138-1142, 2009.

ENE, A.; SU, M.; LEMAIRE, S.; ROSE, C.; SCHAFF, S.; MORETTI, R.; LENZ, J.; HERBST, L. H.. Distribution of chelonid fibropapillomatosis associated herpesvirus variants in Florida: molecular genetic evidence for infection of turtles following recruitment to neritic developmental habitats. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 41, n. 3, p. 489-497, 2006.

GALLO, B.M.G.; MACEDO, S.; GIFFONI, B.B. de; BECKER, J.H.; BARATA, C.R. Sea turtle conservation in Ubatuba, Southeastern Brazil, a feeding area with incidental capture in Coastal Fisheries. **Chelonian Conservation and Biology**, Lunenburg, v. 5, n. 1, p. 93-101, 2006.

GREENBLATT, R.J.; QUACKENBUSH, S.L.; CASEY, R.N.; ROVNAK, J.; BALAZS, G.H.; WORK, T.M.; CASEY, J.W.; SUTTON, C.A. Genomic variation of the fibropapilloma-associated marine turtle herpesvirus across seven geographic areas and three host species. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 2, p. 1125-1132, 2006.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. **Nucleic Acids Symposium series**, London, v.41, p. 95-98, 2001.

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

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

LIMPUS, C.J.; MILLER, J.D. The occurrence of cutaneous fibropapillomas in marine turtles in Queensland. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 6, p. 70-78, 1996.

NARO-MACIEL, E.; BECKER, H.J.; LIMA, E.H.S.M.; MARCOVALDI, M.A.; DE SALLE, R. Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. **Journal of Heredity**, Washington, v. 97, p. 29-39, 2007.

PATRICIO, A.R.; HERBST, L.H.; DUARTE, A.; VÉLEZ-ZUAZO, V.; SANTOS LOUREIRO, N.; PEREIRA, N.; TAVARES, L.; TORANZOS, G.A. Global phylogeography and evolution of chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus. **Journal of General Virology**, London, n. 93, p. 1035-1045, 2012.

RICKLEFS, R. E. A Economia da Natureza. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 503p.

RODENBUSCH, C.R.; BAPTISTOTTE, C.; WERNECK, M.R.; PIRES, T.T.; MELO, M.T.D.; ATAÍDE, M.W.; DOS REIS, K.D.H.L.; TESTA, P.; ALIEVE, M.M.; CANAL, C.W. Fibropapillomatosis in green turtles *Chelonia mydas* in Brasil: characteristics of tumors and virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v. 111, p. 207-217, 2014.

STRAUSS, E. G.; STRAUSS, J.H. **Viruses and human disease**. 2.ed. Amesterdan: Elsevier, 2006. 461p.

SWINTON, J.; WOOLHOUSE, M.E.M.; BEGON, M.E.; DOBSON, A.P.; FERROGLIO, E.; GRENFELL, B.T.; GUBERTI, V.; HAILS, R.S.; HEESTERBEEK, J.A.P.; LAVAZZA, A.. ROBERTS, M.G.; WHITE, P.J.; WILSON, K. Microparasite transmission and persistente. IN: HUDSON, P.J.; RIZZOLI, A.; GRENFELL, B.T.; HEERTERBEEK, H.; DOBSON, A.P. **The ecology of Wildlife Diseases**. New York: Oxford University Press, 2001. 197p.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TOMPKINS, D.M.; DOBSON, A.P.; ARNEBERG, P.; BEGON, M.E.; CATTADORI, I.M.; GREENMAN, J.V.; HEERTERBEEK, J.A.P.; HUDSON, P.J.; NEWBORN, D.; PUGLIESE, A.; RIZZOLI, A.P., ROSÀ, R.; ROSSO, F.; WILSON, K. Parasites and host population dynamics. IN: HUDSON, P.J.; RIZZOLI, A.; GRENFELL, B.T.; HEERTERBEEK, H.; DOBSON, A.P. **The ecology of Wildlife Diseases**. New York: Oxford University Press, 2001. 197p.

WORK, T.M.; DAGENAIS, J.; BALAZS, G.H.; SCHUMACHER, J.; LEWIS, T.D; LEONG, J.C.; CASEY, R.N.; CASEY, J.W. *In vitro* biology of fibropapilloma-associated turtle herpesvirus and host cells in Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). **Journal of General Virology**, London, v. 90, p. 1943-1950, 2009.

6 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE US3 QUINASE EM CFPHV (*Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus*) NA COSTA BRASILEIRA

Resumo

O mecanismo de latência encontra-se bem caracterizado para diversos alfa herpesvírus, e os mecanismos de como esta fase se estabelece nos organismos infectados tem sido recentemente elucidados. Uma região curta do genoma de *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV), chamada de US3, é responsável por codificar uma serina/treonina quinase, enzima relacionada principalmente ao mecanismo de latência no sistema nervoso central e também envolvida no retardo das respostas imunológicas a presença do vírus pelo hospedeiro infectado. Neste trabalho foram desenvolvidos *primers* e protocolo de amplificação da sequência do genoma de CFPHV que codifica para esta enzima. Foram selecionados dez fragmentos amplificados deste gene, provenientes de amostras de animais positivos para CFPHV em Ubatuba-SP e Vitória-ES, os quais foram submetidos a análise filogenética por modelo de substituição de aminoácidos. Os resultados demonstraram elevada similaridade destas sequências com aquelas detectadas em outros Testudines, indicando a ancestralidade deste gene em alfa herpesvírus. Também foi possível identificar duas variantes deste gene na costa brasileira, sendo uma delas comum as duas localidades estudadas, enquanto a outra variante foi detectada apenas em Vitória-ES. Mais pesquisas são necessárias para entender o papel desta enzima e de suas variantes na biologia da infecção por CFPHV em tartarugas marinhas.

Palavras-chave: *Chelonia mydas*; CFPHV; Latência; Serina/treonina quinase; US3

Abstract

The latency mechanism is well characterized for several alphaherpesviruses, and the mechanisms of how this stage is established in infected organisms has recently been elucidated. A short region of the genome *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV), called US3, is responsible for encoding a serine / threonine kinase, enzyme mainly related to the latency mechanism of the central nervous system and it is also involved in the delay of immune responses to the presence of the virus by the infected host. In this work, primers and amplification protocol of the sequence of the genome CFPHV encoded for this enzyme were developed. Ten amplified fragments of this gene were selected, from samples from animals positive to CFPHV in Ubatuba-SP and Vitória-ES, which were submitted to phylogenetic analysis by amino acid substitution model. The results showed high similarity of these sequences with those detected in other Testudines, indicating the ancestry of this gene in alphaherpesviruses. It was also possible to identify two variants of this gene on the Brazilian coast, being common in both studied locations, while the other variant was detected only in Vitória-ES. More research is needed to understand the role of this enzyme and its variants in the biology of infection by CFPHV on sea turtles.

Keywords: *Chelonia mydas*; CFPHV; Latency; Serine/threonine kinase; US3

6.1 Introdução

A infecção por herpesvírus é bastante complexa. A maquinaria de fusão do herpesvírus com as células do hospedeiro é formada por pelo menos cinco glicoproteínas do envelope viral, que regulam tanto a fusão quanto a entrada dos herpesvírus nas células do hospedeiro, e a interação com estas células ocorre a partir de glicosaminoglicanas, moléculas polissacarídicas que apresentam unidades repetitivas de dissacarídeos. A interação entre duas glicoproteínas do vírus com estas glicosaminoglicanas dispara uma fusão irreversível entre a célula do hospedeiro e o vírus e, após esta ligação, outras glicoproteínas permitem a entrada do parasita no interior da célula a ser infectada (NORKIN, 2010).

A replicação do vírus no hospedeiro ocorre por um mecanismo de circularização do DNA viral e, em função disto, existem mecanismos especiais que fazem a reparação dos finais das sequências do DNA durante a replicação. Esta replicação ocorre no núcleo e todos os herpesvírus codificam para um grande número de enzimas que estão envolvidas no metabolismo de ácidos nucleicos, como a DNA polimerase e uma proteína que se liga no local de origem da replicação do DNA viral. Os herpesvírus codificam para mais de 70 proteínas, sendo que as proteínas produzidas no início da tradução responsáveis pelo ciclo lítico (STRAUSS; STRAUSS, 2006). Durante a infecção, algumas proteínas alteram a morfologia do núcleo das células infectadas, provocando fragmentação do nucléolo e degradação do cromossomo das células hospedeiras. Em seguida, genes tardios são ativados e promovem a formação dos vírions e a síntese de macromoléculas do hospedeiro é inativada.

Durante o ciclo de latência, uma série de mecanismos é desencadeada para inativar a resposta imunológica do hospedeiro, incluindo o reconhecimento dos epítomos virais pela MHC-I, o recrutamento das células do sistema imune, a ativação do sistema complemento e a apoptose (NORKIN, 2010).

Algumas proteínas são extremamente importantes neste mecanismo de inativação da resposta imune e do mecanismo de apoptose. As quinases codificadas por uma região curta do genoma viral, chamado de US3, são vitais para o *fitness* da infecção latente. Estas enzimas são responsáveis por transferir grupos fosfato para moléculas-alvo, sendo importantes no mecanismo de sinalização celular. A serina/treonina quinase produzidas principalmente pelos alfa herpesvírus estão envolvidas no metabolismo do DNA viral, no acesso dos nucleocapsídeos ao núcleo, em mudanças no citoesqueleto da célula hospedeira, na evasão da resposta antiviral

do hospedeiro e no sistema apoptótico, permitindo que o vírus passe despercebido pelo sistema imune e instale a infecção latente no hospedeiro (DERUELLE; FAVOREEL, 2011).

A região US3 está presente em todos os alfa herpesvírus estudados até o momento, que afetam tanto os seres humanos quanto outros animais. O sequenciamento do genoma de CFPHV (*Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus*) demonstrou também a presença da região US3, que codifica para uma serina/treonina quinase (ACKERMANN et al., 2012). O papel desta enzima tem sido recentemente desvendado por uma série de experimentos realizados com mutantes virais, em que tem sido possível detectar a importância deste agente na biologia dos alfa herpesvírus e da infecção latente, particularmente no sistema nervoso central (OLSEN et al., 2006; MORI, 2012; KOYANAGI et al., 2013; KATO et al., 2014), além de modular e retardar o reconhecimento do antígeno pelo complexo principal de histocompatibilidade (PANDE et al., 2005; LIU et al., 2009). Estas enzimas apresentam duas regiões bastante conservadas, relativas a serina e a treonina, que são fundamentais para a patogênese do vírus (IMAI et al., 2010; KATO et al., 2014).

Devido à importância desta enzima na latência de alfa herpesvírus e aos poucos trabalhos estudando o papel desta enzima no ciclo biológico do vírus em tartarugas marinhas, foram delineados primers e estabelecido protocolo de reação para detecção do gene codificador desta enzima, localizado na região US3 do genoma de CFPHV. Os fragmentos obtidos foram utilizados para estabelecer as relações filogenéticas com outras serina/treonina quinases de herpesvírus, determinar possíveis substituições nestas enzimas em diferentes áreas de alimentação de *Chelonia mydas* e subsidiar estudos futuros sobre o papel deste gene na latência e neuroinvasidade de CFPHV em tartarugas marinhas.

6.2 Desenvolvimento

6.2.1 Áreas de estudo e coleta de dados.

Foram coletadas amostras de pele e tumor de tartarugas verdes provenientes de 3 localidades na costa brasileira: Ubatuba (SP), Vitória (ES) e Fernando de Noronha (PE). Os animais foram capturados no período de 2012 a 2014 e somente foram considerados animais vivos, recém-capturados e devolvidos à natureza após a colheita de amostras, refletindo a presença do vírus nos estoques mistos de *C. mydas* que permanecerão na natureza.

Os animais provenientes de Ubatuba (SP) foram capturados de forma incidental ou por resgate nos municípios de Ubatuba/SP, São Sebastião/SP e Angra dos Reis/RJ, sendo encaminhados ao Centro de Reabilitação do Projeto TAMAR/ICMBio, base de Ubatuba. A região caracteriza-se como área de alimentação de *C. mydas*, com alterações antrópicas em função do adensamento populacional ligado a moradias permanentes e população flutuante, tendo em vista o turismo na região (GALLO et al., 2006).

Em Vitória, no Espírito Santo, as capturas foram realizadas na Companhia Siderúrgica ArcelorMittal Tubarão, município de Serra, localizado a 10 km de Vitória (TORENZANI, 2010). O local de coleta encontra-se na saída de efluentes da companhia, sendo uma importante área de alimentação de tartarugas verdes no litoral capixaba.

Fernando de Noronha (PE) é uma ilha de origem vulcânica localizada a 345 km a oeste de Cabo São Roque/RN e a 545 km de Recife/PE. A ilha abriga duas Unidades de Conservação Federais: uma APA, criada em 1986, e um Parque Nacional Marinho, criado em 1988. É considerada área mista, por representar uma área de alimentação e reprodução de *Chelonia mydas*.

6.2.2 Coleta de amostras de pele e tumor

Os tecidos foram colhidos utilizando material cirúrgico estéril (*punch* ou bisturi) individualizado para cada animal e para cada fragmento de pele e tumor coletado. A região a ser coletada foi previamente higienizada com solução de iodopolvidine e fragmentos de até 0,5 cm foram retirados e armazenados em microtubos contendo solução de álcool 70% e mantidos a -20°C até chegarem ao Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres (LAPCOM), localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde foram mantidos a -80 °C até o processamento.

O processamento prévio das amostras para extração de DNA foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia (LABMAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os tubos foram submetidos a agitação em vórtex e a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido, a - 80 °C, e descongelamento a 56°C, sendo posteriormente clarificadas a 5000g durante 15 minutos, a 4°C, e uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi submetida ao protocolo de extração de DNA.

6.2.3 Extração de DNA

Em uma alíquota de 100 µL do sobrenadante de cada amostra foram adicionados 500 µL de solução de lise (SDS 1%; 100mM EDTA pH 8.0; 20 mM Tris-HCl pH 8.0; água Milli-Q) e 10 µL de Proteinase K. A solução foi homogeneizada em vórtex e incubada *overnight* a 37 °C em termobloco.

Após a incubação, foram adicionados 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio em cada microtubo, que foi posteriormente homogeneizado em vórtex, centrifugado por 10 minutos a 12000g, a 4°C, para a separação de fases. Uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi colocado em outro tubo e adicionou-se 500 µL de propanol. Esta solução permaneceu a - 20 °C por no mínimo 2 horas e, em seguida, centrifugada por 30 minutos a 12000g, a 4°C, para precipitação do pellet.

O sobrenadante foi descartado por inversão e cada pellet foi submetido a lavagem com 1 mL de etanol 70%. A amostra foi novamente centrifugada por 10 minutos e, em seguida o sobrenadante foi desprezada por inversão de tubo.

Cada pellet obtido deste procedimento foi submetido a secagem em termobloco a 56 °C, por 10 minutos, e o material obtido foi eluído em 30 µL de TE pH 8.0 (10mM Tris-HCl; 1 mM EDTA), incubado por 10 minutos a 56 °C e armazenado a - 20 °C até a realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR).

O DNA obtido foi quantificado em NanoDrop 2000C Spectrophotometer (Thermo Scientific) e somente amostras com mais de 0 µg/µL foram submetidos a Reação de PCR.

6.2.4 Delineamento da reação em cadeia pela polimerase (PCR)

As amostras de pele e tumor coletadas foram submetidas à detecção da serina/treonina quinase. Os *primers* utilizados foram desenvolvidos pelo Prof. Paulo Eduardo Brandão (Tabela 6.1). Para a detecção da serina/treonina quinase codificada pela região US3 do genoma de *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV), amostras de tumores e pele positivas para CFPHV foram selecionadas e o DNA extraído foi submetido a diferentes temperaturas de desnaturação, a partir da T_m (50mM NaCl) de 56,7°C, especificada pelo fabricante (IDT-Integrated DNA Technologies), e do conteúdo de GC (55%). Foram realizadas

PCRs utilizando temperaturas de desnaturação (*melting temperature*) entre 57°C e 64°C, sendo selecionada a temperatura que apresentou presença de banda única, entre 600 pb e 700 pb.

Tabela 6.1 – Sequência de *primers* senso e anti-senso utilizados para detecção da serina/treonina quinase em amostras de pele e tumor de *C.mydas*.

Primers	Gene-alvo	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do fragmento	Referência
F-US3B	Similar a uma serina/treonina quinase	F:TAGAGGTTTCGGCTTTGGCTG R:CGCCATTTCAGTTGCTCGAAG	~700 pb	Este estudo

6.2.5 Leitura e análise dos produtos da PCR

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal (25 µL DNA amplificado acrescido de 2 µL de corante Gel Loading Buffer [Invitrogen Carlsbad, CA] em gel de agarose 2,0% (2,0 mg de Agarose Ultra-Pure [Invitrogen Carlsbad, CA]; 100 mL TBE 0,5X [44,58 M Tris-Base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA]) acrescido de tampão de corrida TBE 0,5X pH 8.0 à 110V/50mA. O gel foi corado com SYBR Safe DNA Gel Stain [Invitrogen Carlsbad, CA] e visualizado com luz ultravioleta (UV) em câmara escura (Alphamager). As amostras que revelaram bandas de DNA únicas e com aproximadamente 700pb foram submetidas a purificação, sequenciamento e posteriormente a confirmação através do BLAST- Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL, 1990).

6.2.6 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos

Os produtos da PCR foram recortados do gel de agarose e purificados utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification [GE Healthcare]. Após a purificação, os nucleotídeos foram submetidos ao sequenciamento utilizando o Kit BigDye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems/Austin, TX) de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático (Applied Biosystems/Perkin Elmer, modelo ABI Prism 310 Genetic, FosterCity, CA).

6.2.7 Análise das sequências

As sequências obtidas foram submetidas à análise qualitativa do eletroferograma pelo programa PHRED (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>) e apenas aquelas com valores superiores a 20 foram aceitas e analisadas utilizando os programas BioEdit 5.0.6 (HALL, 2001) e MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2011), alinhadas com Clustal W (THOMPSON et al., 2002), gerando um *contig* a partir das sequências senso e antisenso. Os *contigs* foram submetidos à análise de similaridade através do programa BLAST- Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL, 1990) para avaliar a homologia entre as sequências obtidas e àquelas disponíveis no GenBank.

6.2.8 Análise filogenética

As sequências dos genes estudados foram alinhadas com sequências similares disponíveis no GenBank. A árvore filogenética foi elaborada com o programa MEGA v.6.0 (TAMURA, 2011) utilizando o Método de Inferência Filogenética de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-joining tree*), o modelo de substituição de aminoácidos de Poisson, e a confiabilidade dos ramos da árvore filogenética foi testada com 1000 repetições de *bootstrap*.

6.3 Resultados

6.3.1 Determinação da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A figura 6.1 apresenta os resultados obtidos para 2 amostras positivas para CFPHV. Os valores de temperatura de desnaturação foram arredondados para os valores absolutos mais próximos, com o objetivo de estabelecer o protocolo de PCR. Pode-se observar que as temperaturas de 57°C, 59°C, 60°C e 61°C apresentaram bandas de baixa intensidade ou bandas inespecíficas, enquanto a temperatura de 62°C foi aquela que apresentou bandas únicas e de elevada intensidade. Esta foi a temperatura de desnaturação do *primer* escolhida para estabelecer o protocolo da reação da polimerase em cadeia.

Figura 6.1 – Amplificado de fragmento do gene da serina/treonina quinase da região US3 do genoma de CFPHV em gel de agarose 2,0%. Lad – ladder 100 pb; 1,2 - 57 °C; 3,4- 59 °C; 5,6 - 60 °C; 7,8 - 61 °C; 9-10 - 62 °C

O protocolo de amplificação da região US3 do CFPHV estabelecido foi 94°C a 5 min, seguido de 35 ciclos a 94°C (1 min), 62°C (1 min) e 72°C (1 min), e uma extensão final de 72 °C a 10 min.

Este protocolo foi utilizado para detectar a presença do gene US3 que codifica para uma serina/treonina quinase em CFPHV. Todas as amostras de secreções, pele, tumor e cérebro deste estudo foram submetidas a detecção deste fragmento parcial do gene.

6.3.2 Caracterização molecular de fragmento parcial do gene da serina/treonina quinase em CFPHV

Os resultados do sequenciamento revelaram fragmentos alinhados entre 300pb e 700pb, Para análise filogenética, foram selecionados fragmentos de aproximadamente 400 pb. Após alinhamento com outras sequências disponíveis para este gene em outros vírus pertencentes a família Herpesviridae, foram utilizadas sequências de 125 aminoácidos para elaboração da árvore filogenética.

Foram selecionadas 10 sequências deste fragmento, sendo 5 (cinco) delas provenientes de Ubatuba-SP e as outras 5 (cinco) oriundas de Vitória-ES. A figura 6.2 contém sequências de 125 aminoácidos do gene que codifica para a serina/treonina quinase em 2 subfamílias de Herpesviridae.

Entre os dez fragmentos da serina/treonina quinase estudados, nove deles foram caracterizados temporariamente como VAR.FUS-SP/ES, pois foram encontradas tanto em Ubatuba-SP e Vitória-ES. Todas as amostras estudadas de Ubatuba-SP foram caracterizadas como pertencentes a esta variante da serina/treonina quinase. Uma amostra de Vitória-ES foi caracterizada como VAR.FUS-ES, podendo indicar uma variante específica deste gene nesta localidade.

Figura 6.2 – Análise filogenética de CFPHV (*Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus*) identificado em pele e tumor de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) em Ubatuba-SP e Vitória-ES. A árvore contém sequências de 125 aminoácidos do gene codificador da serina/treonina quinase e representante de duas subfamílias da família Herpesviridae e foi gerada pelo método de *Neighbour-joining*, modelo de substituição de aminoácidos de Poisson, com 1000 repetições de *bootstraps*. O quadro vermelho agrupa herpesvírus identificados em Testudines. As sequências identificadas nas regiões estudadas estão representadas pelo símbolo ★

6.5 Discussão

O herpesvírus tem sido considerado um importante agente infeccioso em quelônios terrestres e aquáticos e o CFPHV está relacionado a fibropapilomatose e outras doenças que acometem tartarugas marinhas (MARSCHANG, 2011; OSSIBOFF et al.; 2015).

Um possível mecanismo de infecção e latência tem sido verificado recentemente em pele de animais saudáveis (ALFARO-NUÑEZ et al., 2014). Mas a latência pode também ocorrer no sistema nervoso central, e há indícios de que este estado de latência é mediado pela ação de

uma serina/treonina quinase, que retarda a apoptose de células infectadas e permite a manutenção do vírus nestes tecidos (KATO et al., 2014). A detecção da presença deste gene no genoma de CFPHV (ACKERMANN et al., 2012) permite sugerir que o mecanismo de latência também ser utilizado por este herpesvírus em tartarugas-marinhas.

A detecção deste gene em amostras de pele, tumor e cérebro em CFPHV de Ubatuba-SP e Vitória-SP, apresentado nos capítulos 3, 4 e 5, pode indicar que este mecanismo de latência seja bastante antigo, tendo em vista a relação evolutiva entre CFPHV e Testudines (HERBST et al., 2004).

Esta serina/treonina quinase, produzida pela região US3 de alphaherpesvirus ou pela ORF66 de *Varicella-Zoster Virus* (VZV), e identificada também em betaherpesvírus, é bastante conservada na subfamília alfa herpesvírus (DERUELLE; FAVOREEL, 2011) e a árvore filogenética da figura 6.2 demonstra as relações de fragmentos parciais do gene produzido pela região US3 do genoma de CFPHV.

A caracterização molecular deste gene em localidades da costa brasileira e a comparação com outras serina/treonina quinases disponíveis no GenBank permitiu identificar a similaridade deste gene com outras sequências de herpesvírus encontradas na Ordem Testudines, reforçando a hipótese de ancestralidade deste gene neste vírus, particularmente na subfamília Alphaherpesvirinae. A topologia da árvore também demonstra um possível ancestral comum entre alfa herpesvírus de Testudines, aves e mamíferos.

A elevada identidade observada entre as sequências de aminoácidos de fragmentos desta serina/treonina quinase de amostras do Brasil (99,2% com VAR.FUS-SP/ES e 98,6% com VAR.FUS-ES) e daquelas descritas por Ackermann et al., 2012, também reforçam que esta quinase apresenta-se bastante conservada em CFPHV.

Os resultados apresentados referem-se a uma análise prévia deste gene. No entanto, pode-se observar uma maior prevalência da VAR.FUS-SP/ES (9 das 10 amostras referem-se a esta variante) enquanto apenas 1 amostra, de Vitória-ES, foi caracterizada como VAR.FUS-ES e a identidade entre estas duas variantes foi de 98,9%. Como esta diferença de 1,1% entre estas duas variantes, de 0,8% entre a sequência da VAR.FUS-SP/ES e 1,4% da VAR.FUS-ES em relação àquelas observadas por Ackermann et al., 2012, provenientes de CFPHV detectados no Hawaii, refletem na biologia da infecção por CFPHV deve ser alvo de estudo. Mudanças específicas em determinados aminoácidos desta enzima podem refletir na maior ou menor infectividade do agente, no mecanismo de latência e manutenção do vírus no sistema nervoso

central, e na proliferação do vírus nos tecidos de tartarugas marinhas. Estes aspectos devem ser alvo de estudos específicos, avaliando a transcrição da proteína em pele, tumor e cérebro, a presença do agente no sistema nervoso central por microscopia eletrônica, e avaliações experimentais *in vitro*, utilizando culturas de células nervosas e epiteliais. Como as culturas de células de tecidos de *C. mydas* ainda não foram estabelecidas, torna-se fundamental ampliar o desenvolvimento de metodologias que permitam manter estas células para avaliar diversos aspectos da biologia deste agente.

6.6 Conclusões

Os resultados preliminarmente observados apontam que há necessidade de compreender os diversos aspectos da biologia de CFPHV em relação ao seu hospedeiro. As diferenças detectadas entre as variantes da serina/treonina quinase de CFPHV do Brasil e do Hawaí podem ser indicativos da severidade dos quadros clínicos da fibropapilomatose, da capacidade de latência do agente ou ainda da possibilidade de determinadas substituições neste gene refletirem em quadros clínicos neurológicos destes animais. O protocolo de detecção da serina/treonina quinase aqui desenvolvido foi utilizado nos outros capítulos para diagnóstico e confirmação da presença do CFPHV, mas devido ao pequeno número de sequências obtidas, os poucos estudos deste gene em alfa herpesvirus de tartarugas-marinhas e a necessidade de um maior investimento na compreensão da estrutura da proteína codificada pelo gene, outros trabalhos devem ser desenvolvidos a partir desta caracterização prévia e inédita da região US3 de CFPHV.

Referências

- ACKERMANN, M.; KORIABINE, M.; HARTMANN-FRITSCH, F.; JONG, P.J.; LEWIS, T.D.; SCHETLE, N.; WORK, T.M.; DAGENAIS, J.; BALAZS, G.H.; LEONG, J.C. The Genome of Chelonid Herpesvirus 5 Harbors Atypical Genes. **PLoS One**, San Francisco, v.7, n.10, p. 1-15, 2012
- ALFARO-NUÑEZ, A.; BERTELSEN, M.F.; BOJESSEN, A.M.; RASMUSSEN, I.; ZEPEDA-MENDOZA, L.; OLSEN, M.T.; GILBERT, M.T.P. Global distribution of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus among clinically healthy sea turtles. **BMC Evolutionary Biology**, Denmark, v. 14, n.206, p.1471-2148, 2014.
- DERUELLE, M.J.; FAVOREEL, H.W. Keep it in the subfamily: the conserved alpha herpesvirus US3 protein kinase. **Journal of General Virology**, London, v. 92, p. 18-30, 2011.

- HERBST, L.H.; ENE, A.; SU, M.; DESALLE, R.; LENZ, J. 2004. Tumor outbreaks in marine turtles are not due to recent herpesvirus mutations. **Current Biology**, London, v. 14, p. R697-R699, 2004.
- IMAI, T.; SAGOU, K.; ARII, J.; KAWAGUCHI, Y. Effects of phosphorylation of herpes simplex virus 1 envelope glycoprotein B by Us3 kinase in vivo and in vitro. **Journal of Virology**, Washington, v.84, p.153-162, 2010.
- KATO, A.; TSUDA, S.; LIU, .; KOZUKA-HATA, H.; OYAMA, M.; KAWAGUCHI, Y. Herpes Simplex Virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral dUTPase and regulates its catalytic activity in infected cells. **Journal of Virology**, Washington, v. 88, n. 1, p. 655-666, 2014.
- KATO, A.; KEIKO, S.; MARUZURU, Y.; KAWAGUCHI, Y. Phosphorylation of a Herpes Simplex Virus 1 dUTPase by a viral protein kinase, Us3, dictates viral pathogenicity in the central nervous system but not at the periphery. **Journal of Virology**, Washington, v. 88, n. 5, p. 2775-2785, 2014.
- KOYANAGI, N.; IMAI, T.; ARII, J.; KATO, A.; KAWAGUCHI, Y. Role of herpes simplex virus 1 Us3 in viral neuroinvasiveness. **Microbiology and Immunology**, Tokio, v.58, p.31-37, 2014.
- LIU, Z.; WINKLER, M.; BIEGALKE, B. Human cytomegalovirus: host immune modulation by the viral US3 gene. **The international journal of biochemistry and cell biology**, Oxford, v.41, p. 503-506, 2009.
- MARSCHANG, R.E. Viruses infecting reptiles. **Viruses**, Basel, n.3, p.2087-2126, 2011.
- MORI, I. Herpes simplex virus US3 protein kinase regulates host responses and determines neurovirulence. **Microbiology and Immunology**, Tokio, v.56, p. 351-355, 2012.
- NORKIN, L.C. Virology – Molecular biology and pathogenesis. Washington: ASM Press, 2010. 725p
- OSSIBOFF, R.J.; RAPHAEL, B.L.; AMMAZZALORSO, A.D.; SEIMON, T.A.; NEWTON, A.L.; CHANG, T.Y.; ZARATE, B.; WHITLOCK, A.L.; MCALOOSE, D. Three novel herpesviruses of endangered *Clemmys* and *Glyptemys* Turtles. **PLoS One**, San Francisco, v.10, n.4, p. 1-10, 2015.
- PANDE, N.T.; POWERS, C.; AHN, K.; FRÜH, K. Rhesus cytomegalovirus contains functional homologues of US2, US3, US6, and US11. **Journal of Virology**, Washington, v.79, n.9, p. 5786-5798, 2005.
- STRAUSS, E.G.; STRAUSS, J.H. **Viruses and human disease**. 2.ed. Amsterdam: Elsevier, 2006. 461p.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta deste trabalho vem ao encontro de uma série de questionamentos sobre como ocorre a infecção por CFPHV e quais são as relações evolutivas entre este patógeno e as tartarugas verdes, principal espécie afetada pela fibropapilomatose, doença causada por este agente.

A apresentação em três capítulos procurou elucidar, de forma didática, os aspectos ligados a latência e ao ciclo de replicação do herpesvírus, bem como possíveis associações entre variantes virais e marcadores moleculares em tartarugas verdes. Os dois primeiros capítulos buscaram compreender a biologia do herpesvírus, através da detecção e caracterização do vírus em duas fases de seu ciclo: na fase de replicação do vírus, determinando a presença do patógeno em secreções e sua possível relação com a disseminação do agente (Capítulo 3) e depois tentando detectar onde este patógeno pode estabelecer infecção latente, sabendo que a latência do herpesvírus pode estar ligada a tecidos nervosos em várias espécies (Capítulo 4). A caracterização molecular do vírus buscou entender se havia alguma associação que pudesse demonstrar coevolução entre o vírus e o hospedeiro. Os resultados apontaram que pode existir uma via de disseminação do agente a partir de secreções e que estes vírus são capazes de estabelecer latência no cérebro destes animais. No entanto, a detecção de uma mesma variante viral nestes dois trabalhos, realizados com animais de diferentes localidades, apontou uma mesma variante presente tanto nas secreções quanto no cérebro.

Neste sentido, o terceiro trabalho (Capítulo 5) permitiu não somente comprovar uma ampla presença de uma mesma variante viral entre São Paulo e Ubatuba (VAR.7), encontrada em secreções, pele, tumores e cérebro (Capítulos 3, 4 e 5), como detectar que variantes virais presentes nestas áreas de alimentação entre 2009 e 2011 não foram encontradas entre 2012 e 2014. A caracterização molecular do vírus demonstrou ainda que é plausível que o vírus seja transportado pelo seu hospedeiro, pois as sequências obtidas do vírus apresentaram elevada similaridade com outras sequências de CFPHV do Atlântico e ainda acometeram, mesmo sem apresentarem coevolução para os marcadores genéticos estudados, uma maioria de indivíduos de tartarugas verdes provenientes das áreas de reprodução também do Atlântico, fortalecendo a hipótese de que a latência pode ser um mecanismo biológico do CFPHV em manter sua associação tendo as tartarugas marinhas como suas hospedeiras. A prevalência elevada de uma mesma variante ainda pode indicar um possível surto nestas duas localidades (Vitória-ES e

Ubatuba-SP), ou mesmo entre estas áreas, afetando principalmente indivíduos de haplótipos de tartarugas marinhas do Atlântico Sul.

O estabelecimento de um protocolo para detecção do gene produtor da serina/treonina quinase vem no sentido de inicialmente detectar a presença desta sequência em CFPHV encontrados no litoral brasileiro, tendo em vista que a sequência depositada no GenBank esta relacionada a herpesvírus do Hawai. A árvore filogenética gerada para sequência de aminoácidos de um fragmento parcial deste gene permitiu identificar a similaridade com o mesmo gene encontrado em outros Testudines. A detecção de variantes de CFPHV para estas sequências pode indicar uma maior ou menor capacidade de uma determinada variante estabelecer latência no sistema nervoso central, mas maiores estudos são necessários para avaliar o papel deste gene nos mecanismos de latência deste vírus.

Assim, estes trabalhos reforçam a necessidade do monitoramento constante não somente da doença, mas também do vírus e suas variantes, e apontam que, tanto a estrutura dos estoques mistos de tartarugas verdes como a caracterização das variantes virais não devem ser tratadas de forma estática, e sim como uma relação dinâmica entre o parasita e seu hospedeiro, ao longo do tempo e considerando as características de cada área em que esta relação é estabelecida.