

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

**Análise da atividade de leucócitos e de bifenilas policloradas aplicada ao  
estudo da fibropapilomatose em *Chelonia mydas*  
(Testudines, Cheloniidae) (Linnaeus 1758)**

**Silmara Rossi**

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

**Piracicaba  
2014**

Silmara Rossi  
Bióloga

**Análise da atividade de leucócitos e de bifenilas policloradas aplicada ao estudo da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) (Linnaeus 1758)**

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

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

**Piracicaba  
2014**

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

Rossi, Silmara

Análise da atividade de leucócitos e de bifenilas policloradas aplicada ao estudo da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) (Linnaeus 1758) / Silmara Rossi. - - Piracicaba, 2014.  
167 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 2014.

1. Tartaruga verde 2. Fibropapilomas 3. Fagocitose 4. *Burst* oxidativo  
5. Citometria de fluxo 6. Bifenilas policlorada I. **Título**

CDD 639.392  
R833a

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

*Dedico esse estudo*

*Aos meus pais José Antonio e Lourdes que sempre me apoiaram, incentivaram meu trabalho  
e se preocuparam com minha educação.*

*À minha sobrinha Gabi que se encanta com a natureza e me proporciona  
momentos inesquecíveis!*

*Ao meu querido felino Gil pela companhia.*

*Às tartarugas marinhas que são maravilhosas!*



## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos muito especiais à minha família: aos meus pais José Antonio e Lourdes, por todo o apoio na minha decisão de fazer o doutorado e principalmente por terem compreendido todos os momentos em que estive ausente... À minha irmã Silvana pelo apoio e à minha querida sobrinha Gabriela por todos os momentos lúdicos proporcionados! Agradeço também ao meu querido e lindo felino, o Gil, que me acompanhou e esteve ao meu lado (literalmente) enquanto eu escrevia a tese.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, a Matu, por ter acreditado no projeto e por todos os seus ensinamentos. Muito obrigada pelas palavras de incentivo nos momentos em que tudo parecia impossível!

Agradeço ao Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo por ter me recebido no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP) permitindo que eu desenvolvesse a parte relacionada às análises cromatográficas. Obrigada pelo apoio no grande desafio que foi o desenvolvimento da metodologia proposta nesse trabalho.

Meus agradecimentos à Angélica María Sánchez-Sarmiento por sua amizade e companhia em muitos trabalhos de campo, durante a realização dos experimentos e em vários eventos científicos nos quais estivemos presentes. Agradeço também à Fabíola Eloísa Setim Prioste por sua disponibilidade e amizade durante as atividades de campo e encontros científicos. A presença de pessoas queridas como elas tornou as atividades muito mais divertidas!

Agradeço muito ao Ralph Eric Thijl Vanstreels por toda sua ajuda e paciência na realização de vários testes estatísticos.

Sou muito agradecida a toda equipe do Projeto TAMAR-ICMBio por toda a disponibilidade ao me receber nas bases durante os trabalhos de campo. Sem esta ajuda meu trabalho não teria sido concluído! Agradecimentos especiais para: Cecília Baptistotte de Vitória/ES; José Henrique Becker e Renato Velloso de Ubatuba/SP; Eduardo Lima e Thereza Damasceno de Almofala/CE; Daphne Wrobel Goldberg de Florianópolis/SC; Armando José Barsante Santos e Luís Felipe Bortolon de Fernando de Noronha/PE. Muito obrigada também ao Marlon Lauro de Melo Batista da Pró-TAMAR (Projeto TAMAR-ICMBio) por sua disponibilidade e aos inúmeros estagiários que estavam presentes e que me ajudaram no manejo das tartarugas verdes amostradas.

Agradeço também a Max Rondon Werneck por toda sua ajuda e paciência durante as coletas iniciais em Ubatuba/SP.

Muito obrigada à equipe do Aquário Municipal de Santos que me ajudou na obtenção de algumas amostras sanguíneas, especialmente aos médicos veterinários Gustavo Dutra e Cristiane Lassalvia.

Sou muito grata às queridas companheiras de trabalho em Almofala/CE: Caroline Kubota e Lilian Mourão. Sem dúvida alguma meu trabalho nesta área foi muito mais divertido com a companhia das duas!

Muito obrigada a Luiz Américo S. Vale do Laboratório de Química Verde do Instituto de Química da USP (IQ/USP) por toda a ajuda durante a difícil “missão” de analisar bifenilas policloradas em amostras sanguíneas de tartarugas! Especialmente por seu bom humor e otimismo nos momentos tensos...

Agradeço também a ajuda de Sérgio Henrique Monteiro do Laboratório de Ecotoxicologia do CENA/USP. Sem ele a conclusão das análises cromatográficas não teria sido possível...

Sou muito grata pela disposição e amizade de Nicolle G. T. de Queiroz Hazarbassanov, do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP), por me ajudar nas análises da citometria de fluxo e pelas valiosas contribuições científicas.

Quero agradecer aos colegas do CENA/USP Jeane Francisco e Graziela Andrade e aos funcionários Rodrigo Pimpinato e Carlos Alberto Dorelli.

Ao funcionário Jorge Oyakawa do Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens da FMVZ/USP e aos funcionários Herculano Pinho Pereira e Vagner Gonçalves Jr. do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da FMVZ/USP.

Sou muito grata à professora Dra. Céline Godard-Codding por ter me recebido em seu laboratório na *Texas Tech University* para uma breve atividade acadêmica e também às suas alunas Sarah Webb, Kayla Campasino, Micah Thal e Rebecca Pezdec por me acompanharem nas atividades práticas e sociais em Lubbock, TX!

Agradecimentos muito especiais à Evelyn Reategui Zirena por toda sua ajuda durante minha estadia em Lubbock e aos outros colegas Luz Merissa, Aaron Conti, Diego Lazo, Ivan Garcia, Francis Loko e Amanda Parra. Sem dúvida alguma a companhia e a amizade destas pessoas foram essenciais durante minha permanência lá!

Agradeço ao professor Alan Zavala por sua recepção em Guasave/Sinaloa, México para uma breve visita e acompanhamento de suas atividades na universidade e no campo. Agradecimentos também à Paula Claussel e Areli Coronado.

Muito obrigada ao professor Carlos Delgado e ao seu aluno Oscar Melo pela disponibilidade em me levar para acompanhar desovas de tartarugas negras no México!

Agradeço ao Carlos Salas que me recebeu no Santuário Mexiquillo (México) para que eu acompanhasse seu trabalho de conservação de tartarugas marinhas *in situ*.

Agradeço pela simpatia e ajuda de Lisette Ayala, de sua família e de Enrique Naranjo durante minha breve passagem pela Cidade do México.

Muito obrigada aos ex-professores de Zoologia da PUC-Campinas, José Cláudio Höfling e Luiza Ishikawa Ferreira, por todos os ensinamentos e apoio durante minha atuação como bióloga.

Sou muito agradecida à Mara Casarin, secretária do Programa de Pós-Graduação Interunidades ESALQ-CENA/USP por toda sua disponibilidade ao esclarecer minhas dúvidas. Agradeço também à equipe da biblioteca pelas correções realizadas.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido (processo 2010/01781).





“No hacen falta alas para hacer un sueño.  
Basta con las manos,  
Basta con el pecho,  
Basta con las piernas y  
Con el empeño”.

Silvio Rodríguez



## SUMÁRIO

RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	17
1 INTRODUÇÃO .....	19
1.1 Objetivos.....	20
1.1.1 Gerais.....	20
1.1.2 Específicos .....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
2.1 Aspectos biológicos e ecológicos da tartaruga verde.....	23
2.2 Ameaças para as tartarugas marinhas.....	29
2.2.1 Fibropapilomatose e as tartarugas verdes.....	30
2.2.1.1 Breve histórico .....	33
2.2.1.2 Ocorrência e prevalência .....	34
2.2.1.3 Curso clínico da fibropapilomatose.....	35
2.2.1.4 Etiologia.....	36
2.3 A utilização de ferramentas científicas para a conservação das tartarugas verdes .....	38
2.3.1 Atividade celular (fagocitose e <i>burst</i> oxidativo).....	38
2.3.2 Parâmetros hematológicos .....	41
2.3.3 Poluentes orgânicos de importância ambiental.....	42
2.3.3.1 Relação entre poluentes orgânicos e doenças, incluindo a fibropapilomatose .....	43
2.3.3.2 Bifenilas policloradas .....	45
Referências .....	46
3 ANÁLISE DE BIOMETRIA E FIBROPAPILOMAS DE TARTARUGAS VERDES, <i>Chelonia mydas</i> (TESTUDINES, CHELONIIDAE) (LINNAEUS 1758), CAPTURADAS EM DIFERENTES ÁREAS DO BRASIL.....	61
Resumo.....	61
Abstract .....	61
3.1 Introdução.....	62
3.2 Desenvolvimento .....	63
3.2.1 Áreas de estudo e métodos de captura das tartarugas .....	63
3.2.2 Coleta de dados biométricos e análises dos fibropapilomas.....	67
3.2.3 Análises estatísticas.....	69
3.3 Resultados e Discussão .....	69
3.3.1 Animais estudados e procedência .....	69
3.3.2 Biometria .....	71
3.3.2.1 Comprimento curvilíneo da carapaça.....	71
3.3.2.2 Massa corporal .....	76
3.3.2.3 Índice de condição corporal .....	78
3.3.3 Análise dos fibropapilomas .....	80
3.4 Conclusões.....	85
Referências .....	85
Anexos.....	88

4 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA ATIVIDADE DE LEUCÓCITOS DE <i>Chelonia mydas</i> (TESTUDINES, CHELONIIDAE) (LINNAEUS 1758) COM E SEM FIBROPAPILOMATOSE.....	91
Resumo.....	91
Abstract.....	91
4.1 Introdução.....	92
4.2 Desenvolvimento.....	94
4.2.1 Obtenção das amostras sanguíneas.....	94
4.2.2 Preparação das amostras para análise da atividade celular.....	96
4.2.2.1 Obtenção de leucócitos usando Percoll™.....	96
4.2.2.2 Preparação das amostras para avaliação da fagocitose e <i>burst</i> oxidativo.....	96
4.2.3 Análise de parâmetros hematológicos.....	97
4.2.3.1 Contagem total de hemácias (He) e de leucócitos (Leu).....	97
4.2.3.2 Contagem diferencial de leucócitos.....	97
4.2.3.3 Determinação do volume globular.....	98
4.2.3.4 Proteína plasmática total (Prot Pl).....	98
4.2.3.5 Dosagem de hemoglobina (Hb).....	98
4.2.3.6 Volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média.....	98
4.2.4 Proposta de utilização de escores para definir o grau de severidade da doença.....	98
4.2.5 Análises estatísticas.....	99
4.3 Resultados e Discussão.....	99
4.3.1 Atividade celular.....	99
4.3.1.1 Intensidade de fluorescência.....	100
4.3.1.2 Deltas da fagocitose e do <i>burst</i> oxidativo.....	105
4.3.1.3 Correlações entre dados biométricos e deltas da atividade celular.....	107
4.3.2 Parâmetros hematológicos.....	108
4.3.3 Grau de severidade da doença e sua ausência.....	113
4.4 Conclusões.....	117
Referências.....	118
Anexos.....	122
Apêndice.....	132
5 ANÁLISE DE BIFENILAS POLICLORADAS EM AMOSTRAS SANGUÍNEAS DE <i>Chelonia mydas</i> (TESTUDINES, CHELONIIDAE) (LINNAEUS 1758) CAPTURADAS EM ÁREAS DE ALIMENTAÇÃO E REPRODUÇÃO DO BRASIL.....	135
Resumo.....	135
Abstract.....	135
5.1 Introdução.....	136
5.2 Desenvolvimento.....	138
5.2.1 Tartarugas verdes estudadas e procedência.....	138
5.2.2 Dados biométricos e classificação dos fibropapilomas.....	139
5.2.3 Colheita das amostras sanguíneas.....	139
5.2.4 Atividade celular.....	140
5.2.5 Etapas para a análise de bifenilas policloradas por cromatografia gasosa.....	141
5.2.5.1 Cuidados analíticos.....	141
5.2.5.2 Soluções-padrão.....	141
5.2.5.3 Validação do método.....	142
5.2.5.4 Extração.....	143
5.2.5.5 Purificação ( <i>Clean-up</i> ).....	143

5.2.5.6 Análise cromatográfica.....	144
5.2.6 Análises estatísticas.....	145
5.3 Resultados e Discussão .....	146
5.3.1 Tartarugas verdes e áreas de captura.....	146
5.3.2 Biometria e fibropapilomas .....	148
5.3.3 Bifenilas policloradas .....	150
5.3.3.1 Validação do método.....	150
5.3.3.2 Análise das concentrações dos congêneres.....	150
5.3.3.3 Correlações com a atividade celular.....	157
5.4 Conclusões.....	159
Referências .....	160
Anexo .....	164
Apêndice.....	164
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	165
ANEXO.....	166



## RESUMO

**Análise da atividade de leucócitos e de bifenilas policloradas aplicada ao estudo da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) (Linnaeus 1758)**

A tartaruga verde (*Chelonia mydas*) é uma tartaruga marinha que se alimenta e nidifica em locais da costa brasileira, ilhas e atóis. Esta espécie tem sido acometida pela fibropapilomatose (FP), doença considerada como uma das mais importantes ameaças à sua sobrevivência e caracterizada por tumores cutâneos benignos. A etiologia é multifatorial e complexa, possivelmente havendo relação entre *Chelonid Fibropapilloma-associated Herpesvirus*, fatores ambientais e genéticos. Foram estudadas 133 tartarugas verdes com e sem tumores provenientes de cinco áreas brasileiras: Florianópolis/SC, Ubatuba/SP, Vitória/ES, Almofala/CE e Fernando de Noronha/PE. Foram obtidos dados de biometria (comprimento curvilíneo da carapaça-CCC, massa corporal-MC e índice de condição corporal-ICC), tamanho (classificado por categorias A, B, C e D), quantidade e localização anatômica dos tumores, além da colheita de amostra sanguínea. Os objetivos foram (1) avaliar a atividade dos leucócitos por citometria de fluxo (fagocitose e *burst* oxidativo); (2) investigar a presença de sete congêneres de bifenilas policloradas (PCBs) e (3) estabelecer correlações entre PCBs e a atividade dos leucócitos. Houve diferenças no CCC entre tartarugas sem tumores de acordo com a área de estudo, na MC e no ICC entre animais acometidos ou não capturados em Ubatuba. Foram quantificados e classificados 1033 tumores de 50 tartarugas verdes, sendo que a quantidade por tartaruga variou de 1 a 61 e a maior parte foi classificada nas categorias de tamanho A (446 tumores) e B (520 tumores) e na região anterior (669 tumores). Foi observada diferença significativa nas concentrações do congêneres PCB 138 entre tartarugas com e sem FP capturadas em Vitória. Animais acometidos tiveram maiores concentrações de todas as PCBs quantificadas, exceto as tartarugas verdes capturadas em Vitória no caso dos congêneres PCBs 118, 138, 153 e 180. PCB 138 foi quantificado em maior concentração nas amostras e PCB 180 em níveis menores. Não foram observadas correlações significativas entre concentrações de PCBs e atividade celular. A FP tem sido amplamente pesquisada e os estudos que visam estabelecer correlações entre poluentes químicos e saúde animal são extremamente importantes, pois podem contribuir para novas direções nos planos de ação para conservação.

Palavras-chave: Tartaruga verde; Fibropapilomas; Fagocitose; *Burst* oxidativo; Citometria de fluxo; Bifenilas policloradas





## ABSTRACT

**Analysis of leukocyte activity and polychlorinated biphenyls applied to the study of fibropapillomatosis in *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) (Linnaeus 1758)**

The green sea turtle (*Chelonia mydas*) feeds and nests in Brazilian coast, islands and atolls. This species has been affected by fibropapillomatosis (FP), disease considered one of the most important threats to its survival and characterized by benign skin tumors. The etiology is multifactorial and complex, possibly having relation between Chelonid Fibropapilloma-associated Herpesvirus, environmental and genetic factors. Were studied 133 green sea turtles with and without FP from five Brazilian areas: Florianópolis/SC, Ubatuba/SP, Vitória/ES, Almofala/CE and Fernando de Noronha/PE. Were taken biometric data (curved carapace length-CCL, body mass-BM and body condition index-BCI), as well as size (classified by categories A, B, C and D), numbers and anatomical distribution of tumors, besides blood sample collection. The aims were (1) to assess leukocytes activity by flow cytometry (phagocytosis and oxidative burst); (2) to investigate the presence of seven congeners of polychlorinated biphenyls (PCBs) and (3) to establish correlations between PCBs and leukocytes activity. There were differences in CCL between turtles without FP according to the study area, in BM and BCI between affected and non-affected animals caught in Ubatuba. Were quantified and classified 1033 tumors of 50 green sea turtles, the number of tumors ranged from 1 to 61 and the most part of them was classified in categories of size A (446 tumors) and B (520 tumors) and in anterior region (669 tumors). Was observed difference in PCB 138 concentrations between green sea turtle with and without FP caught in Vitória. Affected animals had higher concentrations of all PCBs quantified, except green sea turtles caught in Vitória in the event of PCBs 118, 138, 153 and 180. Were quantified highest concentrations of PCB 138 and lowest of PCB 180. There were not significant correlations between PCBs concentration and leukocyte activity. The FP has been widely investigate and the studies that aimed to establish correlations between pollutants and animal health are very important, because can contribute for new directions in sea turtle conservation issues.

Keywords: Green sea turtle; Fibropapillomas; Phagocytosis; Oxidative burst; Flow cytometry; Polychlorinated biphenyls



## 1 INTRODUÇÃO

Cinco espécies de tartarugas marinhas utilizam áreas brasileiras para alimentação e sítios de desova: *Chelonia mydas* (tartaruga verde), *Caretta caretta* (tartaruga cabeçuda), *Lepidochelys olivacea*, *Eretmochelys imbricata* (tartaruga-de-pente) e *Dermochelys coriacea* (tartaruga-de-couro).

A história natural das tartarugas marinhas é difícil de ser estudada por causa dos deslocamentos e das migrações entre os habitats de alimentação e reprodução. A relação entre os seres humanos e as tartarugas marinhas existe há muito tempo, desde quando o homem iniciou suas atividades nos oceanos e nas áreas costeiras. Sendo assim, durante muitos anos as tartarugas marinhas foram consideradas um recurso alimentar ideal e por isso a pressão de caça foi uma forte ameaça à sobrevivência destes animais. Há outras ameaças relacionadas às ações antrópicas (destruição de habitats, desenvolvimento costeiro, poluição ambiental e atividades pesqueiras) e por isso a conservação destes quelônios torna-se um desafio constante e crescente.

Além das ações antrópicas, a fibropapilomatose (FP) tem sido apontada como uma importante ameaça à sobrevivência da tartaruga verde. Isso porque esta espécie é a mais afetada, por razões ainda desconhecidas. Por este motivo, a doença é também denominada *Green Turtle Fibropapillomatosis* (GTFP) e é caracterizada por tumores (fibropapilomas) cutâneos benignos, com causa multifatorial e etiologia complexa.

Quando as tartarugas verdes migram dos locais de alimentação oceânicos para as áreas costeiras, o hábito alimentar muda de onívoro à herbívoro. É estabelecido que nos ambientes costeiros há exposição dos animais a uma maior concentração de poluentes, gerando um aumento da prevalência desta doença nestes locais.

A doença possui distribuição mundial cuja prevalência pode variar de 0 a 92% dependendo da região analisada. No Brasil os locais utilizados para a nidificação (Ilha da Trindade/ES, Reserva Biológica do Atol das Rocas/RN e Arquipélago de Fernando de Noronha/PE) apresentam prevalência nula.

Um herpesvírus específico é apontado como causa primária (*Chelonid Fibropapilloma-associated Herpesvirus*), associado a fatores genéticos e ambientais. Há registro da doença em diversas regiões do mundo onde há ocorrência dessa espécie, bem como registros em outras espécies de tartarugas marinhas. Além da manifestação externa, alguns animais desenvolvem tumores internos associados (atingindo órgãos como rins e

fígado) em um estágio mais avançado da doença. Entretanto a ocorrência de tumores internos em animais capturados no Brasil é incomum.

Devido ao fato dos tumores afetarem os movimentos de hidrodinâmica e conseqüentemente comprometer os deslocamentos e as migrações dos animais afetados, a doença é considerada debilitante e fatal. Entretanto, estudos e monitoramentos dos animais acometidos têm demonstrado que muitas vezes pode haver recuperação por meio da remoção dos tumores ou pela regressão natural dos mesmos. Por outro lado, há relatos de recapturas de animais que haviam sido soltos após a recuperação e que apresentaram reincidência dos fibropapilomas.

A influência do meio ambiente sobre o estabelecimento da doença tem sido levantada por diversos autores. Os poluentes químicos, dentre eles as bifenilas policloradas (PCBs), podem induzir o vírus latente à infecção ou causarem imunossupressão, facilitando o desenvolvimento ou persistência da FP. PCBs são compostos considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs) e foram amplamente utilizados até sua proibição na década de 1970 nos Estados Unidos. As fontes atuais são provenientes de liberações que ocorreram no passado e à formação não intencional a partir de processos químicos envolvendo matéria orgânica e cloro como resultado da combustão incompleta ou reações químicas.

A fagocitose e o *burst* oxidativo são importantes ferramentas de defesa celular e a citometria de fluxo representa grande vantagem em relação às técnicas anteriormente utilizadas para a avaliação destas atividades, pois é possível discriminar as populações celulares com maior velocidade, menor quantidade de células e de forma quantitativa.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Gerais

- Analisar, por citometria de fluxo, a atividade dos leucócitos de tartarugas verdes com e sem fibropapilomas, através da fagocitose induzida por Zymosan A (*Saccharomyces cerevisiae*) Bio Particles<sup>®</sup>, Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 conjugate e do *burst* oxidativo induzido por PMA (miristato-acetato de forbol);
- Investigar a presença de bifenilas policloradas (PCBs) em amostras sanguíneas de tartarugas verdes acometidas ou não pela fibropapilomatose;

- Estabelecer correlações entre os PCBs e a atividade celular de tartarugas acometidas e não acometidas nos locais pré-determinados (onde a prevalência da GTFP seja menor, maior ou ausente).

#### 1.1.2 Específicos

- Aprimorar a metodologia previamente desenvolvida para a análise da atividade dos leucócitos de tartarugas marinhas, utilizando a citometria de fluxo;
- Desenvolver uma metodologia para detectar e quantificar PCBs em sangue total de tartarugas marinhas;
- Correlacionar os resultados da análise de atividade celular com o grau de severidade da fibropapilomatose doença e sua ausência;
- Analisar o perfil hematológico de tartarugas com e sem tumores, correlacionando os resultados dos parâmetros avaliados com o grau de severidade da fibropapilomatose e sua ausência;
- Verificar a presença de correlações entre dados biométricos e resposta aos estímulos aplicados na avaliação da atividade celular;
- Correlacionar os resultados da análise de atividade celular com as concentrações de PCBs quantificadas nas amostras sanguíneas;
- Gerar resultados que possam ser válidos ao plano de ação para conservação das tartarugas marinhas, em especial da *Chelonia mydas*.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos biológicos e ecológicos da tartaruga verde

A tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), popularmente denominada tartaruga verde ou aruanã (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011a) (Figura 2.1), é caracterizada por possuir carapaça com coloração negra nos filhotes, café nos indivíduos imaturos e muita variação nos adultos, sendo geralmente café, amarelo creme (PRITCHARD; MORTIMER, 2000) ou tons que variam do verde oliva ao marrom (ERNST; BARBOUR, 1989). A cabeça possui forma arredondada com largura de até 15 cm, quatro pares de escamas pós-orbitais e um par de escamas pré-frontais (Figura 2.2) (PRITCHARD; MORTIMER, 2000). É classificada no Filo Chordata, Classe Reptilia, Ordem Testudines, Subordem Cryptodira e Família Cheloniidae (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011b).

Além de alimentarem-se de uma variedade de plantas aquáticas pertencentes aos gêneros *Thalassia* (conhecida por grama da tartaruga), *Syringodium*, *Halophila*, *Posidonia*, *Halodule* e *Zostera* e de algas dos gêneros *Chaetomorpha*, *Sargassum* e *Hypnea*, as tartarugas verdes utilizam também como recurso alimentar algumas águas-vivas, salpas e esponjas. No leste do Pacífico tartarugas verdes são vistas predando moluscos, peixes, poliquetas e águas-vivas (SPOTILA, 2004). Estudos realizados no sudeste do Brasil usando o índice de avaliação ecológica (abundância de espécies de macrófitas bênticas marinhas como indicadoras do ecossistema) para avaliar a qualidade ambiental, distinguiram várias espécies de plantas aquáticas e algas encontradas no estômago de espécimes de tartarugas verdes encalhadas mortas. Foram dez espécies de algas classificadas no grupo Rhodophyta (algas pardas): *Halymenia floresii*, *Gracilariopsis tenuifrons*, *Gelidium floridanum*, *Rhodomenia pseudopalmata*, *Chondracanthus elegans*, *Hypnea musciformis*, *Pterocladia capillacea*, *Gracilaria mammillaris*, *Larurencia* spp. e *Gymnogongrus griffithsiae*; seis espécies pertencentes ao grupo Chlorophyta (algas verdes): *Caulerpa mexicana*, *Ulva fasciata*, *Ulva lactuca*, *Ulva rigida*, *Cladophora vagabunda* e *Chaetomorpha aerea* e uma espécie de planta aquática (*Halodule wrightii*) (SANTOS et al., 2011).





Figura 2.1 – Espécime de *Chelonia mydas*. Foto: Silmara Rossi

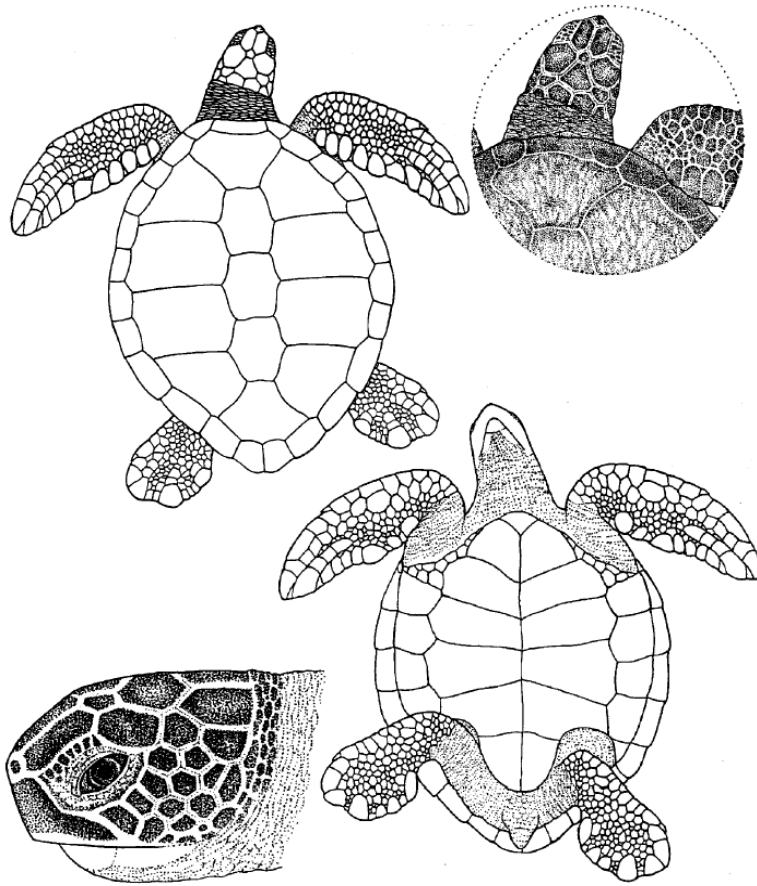


Figura 2.2 – Distribuição das escamas da carapaça, do plastrão e da cabeça da espécie *Chelonia mydas* Fonte: PRITCHARD; MORTIMER (2000)

A tartaruga verde é encontrada em mares tropicais e subtropicais tendo distribuição circungal. Em geral são vistas em latitudes entre 40°S e 40°N, porém há poucos registros visuais no Oceano Pacífico centro-leste e no nordeste do Oceano Atlântico (Figura 2.3). É a espécie de tartaruga marinha que apresenta hábitos mais costeiros, utilizando inclusive estuários de rios e lagos (HIRTH, 1997).

Migram extensivamente através das áreas de alimentação e nidificação, porém passam a maior parte de suas vidas em pequenas áreas alimentando-se de algas e plantas aquáticas. Muitas vezes possuem locais próprios para os descansos noturnos e retornam noite após noite para esses pontos (SPOTILA, 2004). As migrações de tartarugas verdes são realizadas por centenas ou milhares de quilômetros (LUTZ, 1997; PLOTKIN, 2003).

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



Figura 2.3 – Mapa de distribuição mundial da espécie *Chelonia mydas*. Fonte: MARCOVALDI; SANTOS; SALES (2011b)

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

A tartaruga verde permanece na fase pelágica até cerca de 20 a 30 cm de comprimento retilíneo de carapaça - CRC (MEYLAN; MEYLAN, 2000), possuindo hábito alimentar onívoro com tendência carnívora nessa fase (BJORNDAL, 1997). Após a fase pelágica tornam-se herbívoras (MORTIMER, 1982) e dirigem-se à costa fixando residência em alguns pontos costeiros. Com o tamanho entre 38 e 60 cm elas se movem para áreas de baixa profundidade com bancos de algas (SPOTILA, 2004).

Os “habitats de desenvolvimento”, zonas nas quais são encontradas tartarugas imaturas, geralmente consistem de áreas de alimentação costeiras nas quais as tartarugas vivem durante seu desenvolvimento e até a fase adulta. Os momentos de entrada e saída desses habitats parecem estar relacionados com definidos intervalos de tamanho para algumas espécies e a recaptura repetidas vezes de um mesmo indivíduo na mesma área ao longo de vários anos sugere certa residência nesses locais por um período de tempo (MEYLAN; MEYLAN, 2000). Estudos no Havaí demonstraram que tartarugas com 35 cm de CRC vão para áreas costeiras onde passam a maior parte de suas vidas (BALAZ, 1980). No Pacífico, alguns juvenis permanecem em recifes alimentam-se de algas enquanto outros se deslocam próximos à costa alimentando-se de plantas aquáticas. Na Austrália e no Havaí, permanecem no mar até alcançarem tamanho aproximado de 35 cm. Juvenis normalmente tornam-se residentes em suas áreas de alimentação permanecendo nelas por muitos anos até atingirem a maturidade, no sul da Grande Barreira de Recife já foram registrados juvenis que ficaram nas áreas de alimentação por mais de 20 anos (SPOTILA, 2004) ou até que atinjam a maturidade sexual (GULKO; ECKERT, 2004). Estudos sobre tendências temporal e espacial específicas de causas de encalhes no Arquipélago havaiano relataram cinco espécies de tartarugas marinhas em 3.861 encalhes no período entre 1982 e 2003. As tartarugas verdes compreenderam 97% destes encalhes, cuja composição refletiu uma estrutura demográfica de população de *C. mydas* residente e relativa abundância em águas havaianas (CHALOUPKA et al., 2008a). As tartarugas verdes sendo animais tipicamente solitários podem ocasionalmente se agregar em locais de alimentação, com águas rasas e abundância de algas (FAO, 1990).

A tartaruga verde atinge a maturidade sexual mais tarde que as demais espécies de tartarugas marinhas. Isso ocorre por causa do crescimento mais lento devido à sua dieta herbívora. Em média quando possuem entre 25 e 50 anos estão aptas à reprodução (CHALOUPKA et al., 2004).

Os principais sítios reprodutivos no Atlântico localizam-se na Costa Rica, ilha de Ascensão (Reino Unido), Guiné Bissau (África), México, Suriname e Ilha da Trindade (Brasil) (BRODERICK et al., 2006; MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011a), Aves

(Venezuela), Bioko (Guiné Equatorial) e o Atol das Rocas (Brasil) (NARO-MACIEL et al., 2007).

No Brasil a tartaruga verde desova na Ilha da Trindade/ES, Reserva Biológica do Atol das Rocas/RN e Arquipélago de Fernando de Noronha/PE. O litoral norte da Bahia é também utilizado como área para nidificação e há raros registros de desovas nos estados do Rio Grande do Norte, Sergipe, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Além disso, são frequentemente encontradas nas áreas de alimentação monitoradas pelo Projeto Tamar-ICMBio (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011a) (Figura 2.4).

Em uma única estação reprodutiva, as tartarugas verdes podem formar de um a sete ninhos. Cada ninho contém em média 110 ovos e todo o processo de desova pode levar de duas a três horas. As fêmeas geralmente passam de 12 a 14 dias no oceano entre os eventos de desova e raramente desovam no ano seguinte, podendo demorar de quatro a seis anos para desovar novamente (SPOTILA, 2004).

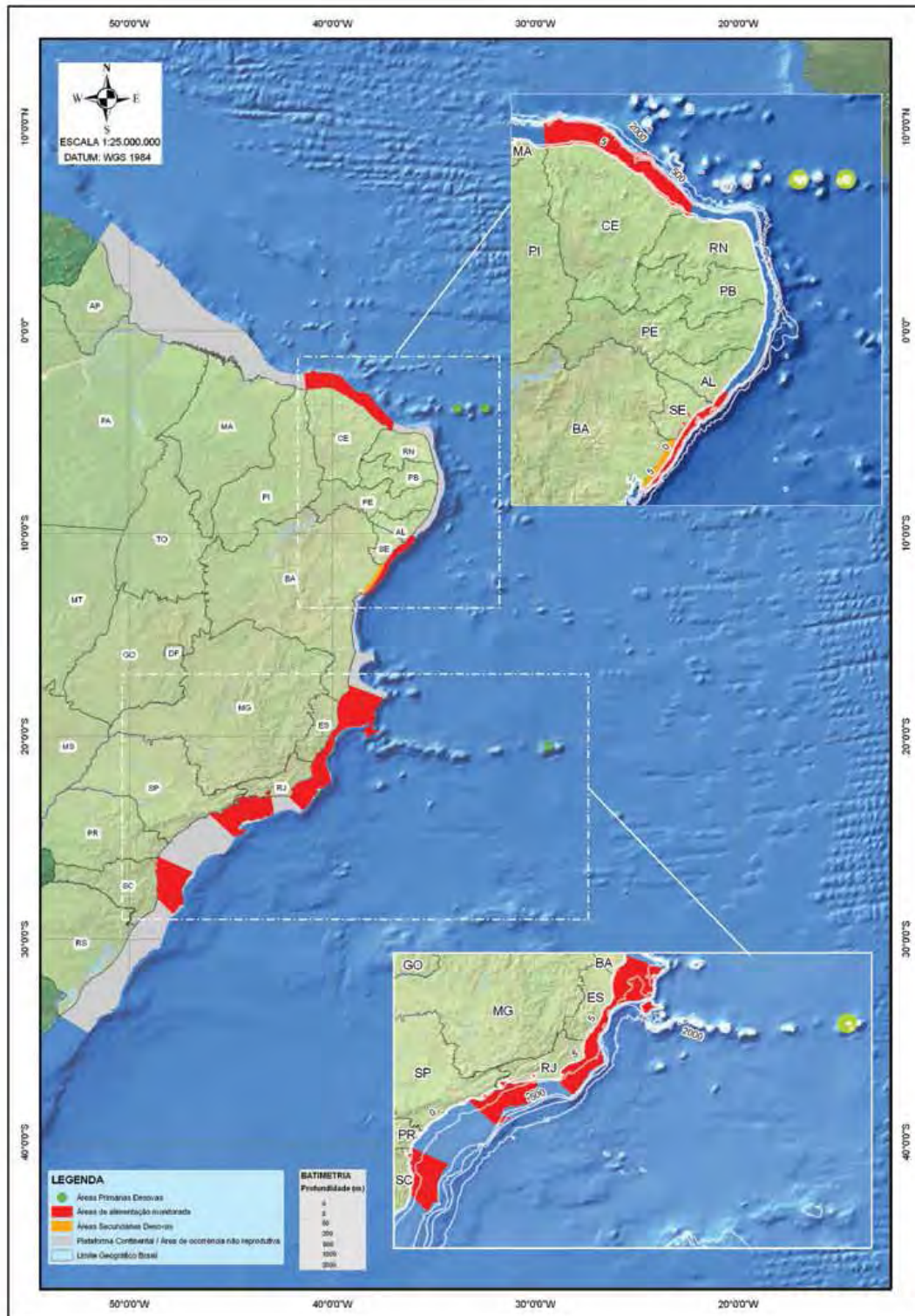


Figura 2.4 – Distribuição geográfica da tartaruga marinha *Chelonia mydas* no Brasil. Fonte: MARCOVALDI; SANTOS; SALES (2011a)

## 2.2 Ameaças para as tartarugas marinhas

Os quelônios marinhos são muito importantes para o equilíbrio do ecossistema marinho, pois contribuem para a saúde e manutenção dos recifes de corais, estuários e praias arenosas realizando eficientes funções ecológicas (ECKERT et al., 2000), portanto protegendo estes animais protegem-se os mares e as áreas costeiras (FRAZIER, 1999).

O vínculo entre humanos e tartarugas marinhas está efetivado há muito tempo, desde que o homem se estabeleceu nas regiões costeiras e iniciou várias atividades nos oceanos. Durante inúmeras gerações, as comunidades costeiras dependeram das tartarugas marinhas e de seus ovos para obtenção de proteínas e outros produtos e em muitas regiões do mundo essa prática ainda continua (ECKERT et al., 2000). Durante séculos, pessoas ao redor do mundo, consideram a tartaruga verde um recurso alimentar ideal. Isso porque são abundantes e assim tornam-se fáceis de serem capturadas na água ou na areia (SPOTILA, 2004). Dessa forma, são de suma importância os esforços ligados à mudança do conceito de que a conservação representa um obstáculo ao desenvolvimento socioeconômico e à sobrevivência humana. As populações costeiras que dependem das tartarugas marinhas para seu sustento devem ser atraídas aos programas de pesquisa e conservação, pois estes retornam muitos benefícios à comunidade (MARCOVALDI; THOMÉ, 2000).

As ameaças às tartarugas marinhas estão associadas a inúmeros fatores: destruição de habitats; ação antrópica nas praias de nidificação, (BUGONI; KRAUSE; PETRY; 2001), como iluminação, trânsito de veículos e pessoas, obstáculos (resíduos sólidos, equipamento de trabalho ou veículos estacionados), derrames de petróleo (WITHERINGTON, 2000) e outros tipos de poluição; atividades pesqueiras; alterações climáticas; desenvolvimento costeiro; patógenos e consumo e uso de carapaça, carne e ovos (MAST et al., 2005) e também doenças como a fibropapilomatose (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011c). Os ninhos muitas vezes estão sujeitos à ação da erosão nas praias, das inundações por marés e tempestades, dos predadores naturais e dos coletores de ovos (BOULON, 2000). No entanto, talvez nenhuma das ameaças tenha causado um declínio de populações de maneira tão devastadora como a captura contínua de tartarugas juvenis e adultas (MARCOVALDI; THOMÉ, 2000). A captura incidental é amplamente reconhecida como fator de alta mortalidade e danos para as tartarugas marinhas (ORAVETZ, 2000).

Muitas populações de *C. mydas* têm sido esgotadas pela exploração, levando ao fato preocupante de que possam estar globalmente em perigo (CHALOUPKA et al., 2008b). Apesar do aumento das pesquisas e dos esforços em conservação das tartarugas verdes, sua

demografia em áreas de alimentação ainda permanece pouco compreendida (SEMINOFF et al., 2003).

O Grupo Especialista em Tartarugas Marinhas da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) - *The IUCN Marine Turtle Specialist Group* (MTSG) é responsável por conduzir avaliações da Lista Vermelha (*Red List*) de cada espécie de tartaruga marinha em escala global. No entanto, o MTSG tem debatido sobre a relevância e a utilidade destas avaliações, pois podem não demonstrar a realidade das populações locais e regionais com tendências a trajetórias diferentes (GODFREY; GODLEY, 2008). Dessa forma, este grupo teve como desafio: definir unidades populacionais para avaliações e desenvolver um sistema para avaliar o *status* de conservação dessas unidades (WALLACE et al., 2011).

De acordo com a classificação atual da IUCN, a tartaruga verde está incluída como espécie em perigo na Lista Vermelha e como vulnerável na Avaliação do Estado da Conservação elaborado para essa espécie no Brasil (ALMEIDA, 2011), constando no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MARTINS; MOLINA, 2008).

Muitas tartarugas verdes têm sido acometidas pela fibropapilomatose (FP), doença caracterizada pelo desenvolvimento de tumores cutâneos benignos (ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997). Essa doença é considerada pandêmica e está associada à presença de um alfa-herpesvírus (GREENBLATT et al., 2005).

### 2.2.1 Fibropapilomatose e as tartarugas verdes

A fibropapilomatose é conhecida também como *Green Turtle Fibropapillomatosis* (GTFP) por acometer principalmente a tartaruga verde (*Chelonia mydas*) (HERBST et al., 1998). Os fibropapilomas (Figura 2.5 A e B) são neoplasias benignas de origem epitelial, caracterizadas por tumores cutâneos múltiplos, que podem interferir na hidrodinâmica desses animais, comprometendo consequentemente a alimentação (ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997), sendo considerada doença debilitante e fatal (AGUIRRE et al., 1998).

O curso clínico e a duração da doença são pouco compreendidos. Sabe-se, entretanto, que há casos de remissão dos tumores, bem como de aumento do tamanho destes e surgimento de novas formações (EHRHART; SINDLER; WITHERINGTON, 1986; JACOBSON et al., 1989; EHRHART, 1991).

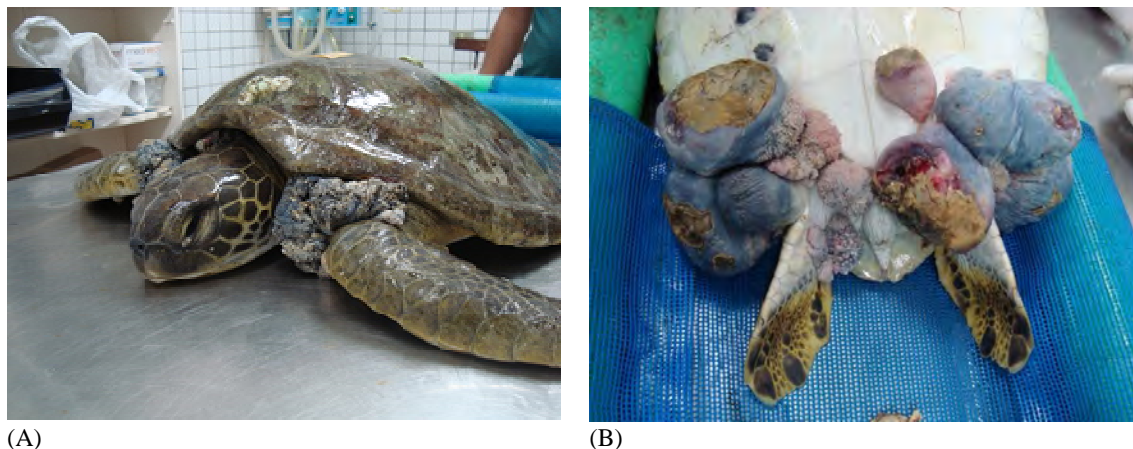


Figura 2.5 (A e B) – Espécimes juvenis de *Chelonia mydas* com fibropapilomatose. Fotos: Silmara Rossi

Os fibropapilomas podem se desenvolver em diversas partes do corpo do animal, como nadadeiras, olhos, base da cauda, regiões oral, cervical, inguinal, axilar e carapaça, incluindo suturas entre escudos adjacentes e órgãos cavitários como rins, fígado e pulmões (JACOBSON et al., 1989, 1991; NORTON et al., 1990; HERBST, 1994; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997; WORK; BALAZS, 1997).

Os tumores possuem diferentes colorações (de rosa à negra), tamanho e quantidade (BAPTISTOTTE, 2007; ROSSI, 2007), sendo que as maiores formações podem estar ulceradas e necróticas, sésseis ou pedunculadas e com textura lisa ou verrucosa (JACOBSON et al., 1989).

Como resultado da redução no sucesso reprodutivo, as neoplasias podem prejudicar a conservação dos animais afetados, pois podem alterar a dinâmica de populações direta ou indiretamente resultando na redução populacional. Estabelecer a prevalência de uma neoplasia é importante para o entendimento da doença e sua importância para a conservação da espécie. Nos casos de neoplasia em animais de vida selvagem, o foco é geralmente o entendimento da biologia dessa afecção, prevenção e estratégias de intervenção, bem como nos esforços de políticas de conservação ou na redução da incidência de tumores induzidos pela ação antropogênica. O foco não é o tratamento. A fibropapilomatose tem distribuição global e pode ser considerada panzoótica, sendo comumente encontrada em *C. mydas* com alguns registros em *Dermochelys coriacea* (tartaruga de couro), *Lepidochelys kempii*, *Eretmochelys imbricata* (tartaruga de pente) (McLOOSE; NEWTON, 2009), *Caretta caretta* e *Lepidochelys olivacea* (HERBST et al., 1998; AGUIRRE et al., 1999; BAPTISTOTTE et al., 2001). Estudos histopatológicos com amostras de tartarugas negras (*Chelonia mydas agassizii*) capturadas incidentalmente na Bahía Magdalena, Baja California Sur, México, revelaram pela primeira



vez dois fibromas, embora não tenham sido observadas manifestações cutâneas características de fibropapilomas (TAPIA, 2005). Exames histopatológicos realizados em um espécime de *C. mydas* capturado na costa sul do Estado de Pernambuco, Brasil, comprovaram presença de lesões características de FP na pele e nos pulmões (BRITO et al., 2004).

Estudos no Havaí entre os anos de 1982 e 2003 relataram que a fibropapilomatose foi uma das mais significativas causas de encalhe e mortalidade para tartarugas verdes (28%), seguida por traumas causados por anzóis e linhas de pesca (7%), traumas por redes de emalhe (rede de espera de superfície) (5%), atropelamento por barcos (2,5%) e ataques por tubarões (2,7%). Causas diversas foram responsáveis por 5,4% dos encalhes, enquanto que 49% das ocorrências foram atribuídas a causas desconhecidas devido ao avançado estado de decomposição das carcaças ou à presença de lesões não indicativas de causa de morte (CHALOUPKA et al., 2008a).

Entretanto, nem todos os indivíduos acometidos morrem e observações de Chaloupka et al. (2009) sugerem que muitas tartarugas verdes com FP encontradas nas águas havaianas puderam se recuperar.

Há também registros indicando regressão dos tumores. Ehrhart (1991) ao avaliar dados de recaptura de 25 tartarugas verdes que tinham fibropapilomas na primeira captura, constatou que aproximadamente 16% estavam livres da doença na recaptura posterior. Bennett et al. (1999) observaram regressões de tumores em 32% das tartarugas doentes. Hirama e Ehrhart (2007) constataram que 88% das tartarugas recapturadas apresentaram regressão de tumores.

No Brasil, estudos na região costeira de Itaipu (orla oceânica de Niterói/RJ) entre julho de 2008 e agosto de 2013 registraram casos de regressão de fibropapilomas em tartarugas verdes. Foram capturados 233 espécimes e a prevalência na área e período de estudo foi de 38,6%. Cinquenta e sete indivíduos (63,3%) apresentaram fibropapilomas visíveis na primeira captura e trinta e três (36,7%) passaram a apresentar sinais de tumores apenas na recaptura. Sete tartarugas (13,2%) apresentaram sinais evidentes de regressão de pelo menos um tumor (TAGLIOLATTO, 2013).

Outros estudos, desenvolvidos no Brasil, revelaram lesões compatíveis com uma doença de etiologia viral através de análises histopatológicas, imuno-histoquímicas, ultra-estruturais e moleculares dos tecidos tumorais, além de sangue para análises hematológicas, bioquímicas e moleculares (MATUSHIMA et al., 1999, 2001; MATUSHIMA, 2003). Em 2001, amostras de tumores, de sangue, saliva e secreção ocular de *C. mydas* com FP, da região de Ubatuba/SP, foram coletadas visando à detecção de um possível herpesvírus ou papilomavírus (MEHNERT et al., 2001). Os resultados obtidos pela microscopia eletrônica e

pelas reações de PCR, utilizando *primers* descritos por Vandevanter et al. (1996) revelaram a presença de um possível herpesvírus nas amostras analisadas. Monezi et al. (2006) analisaram amostras de sangue e tumor de animais provenientes da região de Ubatuba-SP, no período de 2001-2006, e confirmaram a presença da banda específica de 207 pb dos herpesvírus. Também foram desenvolvidos estudos sobre distribuição anatômica de fibropapilomas (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2012a), índice de condição corporal (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2012b, 2013a, 2013b) e monitoramento de pesticidas organoclorados em fígado e tecido adiposo de tartarugas verdes capturadas em Ubatuba/SP, Praia Grande/SP e Vitória/SP (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2013c; SÁNCHEZ-SARMIENTO, 2013) e de bifenilas policloradas (PCBs) em tecidos adiposo, muscular, hepático e renal de espécimes capturados em Ubatuba/SP (SILVA, 2009). Estudos correlacionando perfil hematológico e grau de severidade da doença utilizando a área de tumor (cm<sup>2</sup>) por tartaruga revelou que não houve diferença entre os quatro grupos analisados (grupo 0: animais não acometidos; grupo 1: leve; grupo 2: moderado e grupo 3: grave) (ROSSI, 2007; ROSSI et al., 2009a). Estudos utilizando a citometria de fluxo para avaliar a atividade de leucócitos *in vitro* focaram inicialmente no desenvolvimento de metodologia apropriada para essa análise (ROSSI, 2007; ROSSI et al., 2009b) e constataram diferenças entre as células que não receberam estímulo e as que foram estimuladas, porém não entre animais com e sem tumores (ROSSI et al., 2012a, 2013a, 2013c). Além disso, tem sido desenvolvida uma proposta de utilização de escores para determinar o grau de severidade da doença com base na quantidade e no tamanho dos tumores por tartarugas (ROSSI et al., 2012b, 2013b). Monitoramento de PCBs em amostras sanguíneas foram realizados por Rossi et al. (2013d, 2013e).

### **2.2.1.1 Breve histórico**

O primeiro registro ocorreu em 1936 em uma fêmea de *C. mydas* proveniente de *Key West* (Florida, USA) mantida no Aquário de New York e posteriormente a ocorrência de fibropapilomas foi observada e registrada em tartarugas verdes de vida livre capturadas em *Key West* (SMITH; COATES, 1938) e *Cape Sable* (Florida, USA) (LUCKE, 1938). Desde 1975 as tartarugas verdes têm sido monitoradas ao longo da Flórida central-leste na *Mosquito Lagoon* (HIRAMA; EHRHART, 1999) e não foram encontradas evidências na década de 1970 apesar de que foram poucos os animais capturados neste período. No Havaí, o primeiro caso baseado em observação ocorreu em 1958 em *Kaneohe Bay*, Ilha de Oahu. Desde então, fibropapilomas tem sido registrados em tartarugas encalhadas e por estudos de monitoramento

em áreas de alimentação (AGUIRRE et al., 1994, 1998, 2002). No México o primeiro registro ocorreu na espécie *Lepidochelys olivacea* na Praia Escobilla/Oaxaca na década de 1980, quando a caça das tartarugas marinhas ainda era uma prática legalizada (AGUIRRE et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2000). Posteriormente, Huerta et al. (2000) confirmaram FP em tartaruga de couro (*Dermochelys coriacea*) durante a desova no Estado de Michoacan no ano de 1994. Na Costa Rica a primeira observação de tumores ocorreu em 1982 em uma fêmea da espécie *L. olivacea*, sendo que a FP foi identificada pela primeira vez em população de oliva durante a arribada de outubro de 1987. Uma fêmea desovando foi fotografada demonstrando tumores cutâneos múltiplos medindo 30 mm de diâmetro (AGUIRRE et al., 1999). Na Austrália o primeiro registro ocorreu em uma tartaruga verde juvenil que encalhou em *Baba Head, Shark Bay*, região oeste no ano de 1995 (RAIDAL; PRINCE, 1996).

O primeiro registro no Brasil ocorreu em 1986 no litoral do estado do Espírito Santo e a prevalência para este país foi registrada em 15,41% segundo dados de 2000 a 2005. Não há registro de fibropapilomatose nas áreas de desova: Arquipélago de Fernando de Noronha (PE), Ilha da Trindade (ES) e Atol das Rocas (RN) (BAPTISTOTTE, 2007).

### **2.2.1.2 Ocorrência e prevalência**

É uma doença de distribuição mundial cuja prevalência pode variar de 0 a 92% dependendo da região analisada.

Na Flórida, Foley e colaboradores (2005) apontaram um aumento na prevalência em tartarugas verdes entre 1980 e 1998. Durante o ano de 1985 a FP foi reportada em 29% das 145 tartarugas em *Mosquito Lagoon* e desde 1982 a prevalência na região central de *Indian River System* (120 km ao sul de *Mosquito Lagoon*) tem sido entre 28 e 65%. Entretanto, em um determinado local de *Indian River* a FP não foi observada antes de 1996, porém em 1997 cerca de 5% das tartarugas apresentavam a doença e essa prevalência subiu para 20% em 2001.

No Havaí no período entre 1989 e 1997, a FP foi registrada em 44% das tartarugas amostradas, das quais 17% apresentaram tumores orais. A prevalência anual foi de 42 a 65% (AGUIRRE; LUTZ, 2004) e foi possível notar uma curva na prevalência da doença que persistiu por décadas: após o surto no final dos anos 1980, seguido de um pico em meados da década de 1990, verificou-se um declínio na prevalência da doença, chegando ao redor de 9,4% em 2007 (CHALOUPKA et al., 2009).

Na Praia Escobilla/Oaxaca, México foi observada a presença de tumores em 140 das 9201 fêmeas da espécie *Lepidochelys olivacea* que desovaram (1,5%) durante a arribada de 1997 (AGUIRRE et al. 2000; VASCONCELOS et al., 2000). Calcula-se que cerca de 6 a 10% das fêmeas de *Lepidochelys olivacea* que desovam na Costa Rica tenham FP, sendo que 1% é severamente afetada. Desde a primeira identificação de FP neste país durante a arribada de 1987, com base em observações de campo notou-se que a prevalência e o tamanho dos tumores têm aumentado (AGUIRRE et al., 1999).

Investigações detalhadas feitas por Aguirre et al. (2000) em *Moreton Bay*, Queensland (Austrália) em 1998 descreveram fibropapilomas coletados de 50 tartarugas verdes e de 12 cabeçudas (*Caretta caretta*) demonstrando uma prevalência de 16% e 6% respectivamente. Eram histologicamente similares aos tumores encontrados em tartarugas do Havaí, Flórida, Indonésia e Costa Rica. A presença de tumores na Austrália tem sido reportada por meio de observação visual desde 1988 com prevalência entre 2 e 22% para a espécie *C. mydas* e 1% para *C. caretta* (LIMPUS; MILLER, 1994).

No Brasil, um estudo realizado no período de 2000 a 2005 visando à caracterização espacial e temporal da FP, revelou a ocorrência de 0% nas ilhas oceânicas do Atol das Rocas e do Arquipélago de Fernando de Noronha; 5,96% no Rio de Janeiro; 10,73 % em São Paulo; 15,81% na Bahia; 18,46% em Sergipe; 27,43% no Espírito Santo, 31,43% na região costeira do Rio Grande do Norte e 36,94% no Ceará (BAPTISTOTTE, 2007). A análise de dados de tartarugas verdes encontradas encalhadas em uma faixa litorânea totalizando 332,84 km de extensão de praias (Bacia Potiguar, RN e CE) entre 01/01/2011 a 31/12/2012 revelou que 12,91% dos 1046 animais registrados apresentavam tumores (COSTA, 2013).

### **2.2.1.3 Curso clínico da fibropapilomatose**

Os animais acometidos apresentam distúrbios de flutuação, caquexia, hipoproteinemia, desbalanço eletrolítico, uremia e elevação de enzimas hepáticas (NORTON; JACOBSON; SUNDBERG, 1990). Sabe-se que há casos de remissão dos tumores, bem como de aumento do tamanho destes e surgimento de novas formações (EHRHART; SINDLER; WITHERINGTON, 1986; JACOBSON et al., 1989; EHRHART, 1991; AGUIRRE et al., 1998). As tartarugas acometidas com tumores leves podem recuperar-se espontaneamente, sem tratamento cirúrgico. Já animais com nódulos viscerais têm um prognóstico reservado (KNÖBL; REICHE; MEÑAO, 2011).

O perfil hematológico revela anemia não regenerativa e diminuição progressiva de linfócitos, basófilos, eosinófilos e aumento progressivo de heterófilos e monócitos, concomitante ao aumento da gravidade da doença. (ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997; WORK; BALAZS, 1999). Zwarg et al. (2006) relataram um aumento nos níveis de proteínas plasmáticas nos animais acometidos pela fibropapilomatose.

A influência das atividades antrópicas sobre o estabelecimento da doença também foi levantada após estudos realizados na Flórida (EHRHART, 1991; FOLEY et al., 2005) e no Havaí (BALAZS, 1991) sugerindo o envolvimento de poluentes tóxicos e de toxinas.

Uma avaliação de longo prazo da prevalência das principais doenças crônicas como a fibropapilomatose em vertebrados marinhos é necessária para melhorar nosso entendimento da epizootiologia das doenças marinhas (FOLEY et al., 2005; CHALOUPKA et al., 2009).

#### **2.2.1.4 Etiologia**

Com relação à origem infecciosa, há fortes evidências de que a FP seja causada por um vírus, devido ao súbito aparecimento da doença em novas localizações, a variação da prevalência entre locais muito próximos e a observação de que alguns animais se recuperam da doença. Herbst et al. (1995) demonstraram que os tumores podem ser transmitidos para animais não afetados através da inoculação de homogenizados celulares de fibropapilomas, fato compatível com a presença de um agente infeccioso. Esta parece ser também a explicação mais plausível para o surgimento e a disseminação da doença em tartarugas mantidas em cativeiro (HERBST, 1994). Partículas virais sugestivas de herpesvírus em fibropapilomas de tartarugas verdes foram observadas nesta mesma espécie com doenças cutâneas, conjuntivite, traqueíte e pneumonia (REBELL et al., 1975; JACOBSON et al., 1986, 1991). Em 1998, Drury et al., demonstraram a presença de partículas *herpesvírus-like* e *papilomavírus-like* em quelônios. As técnicas de PCR tem demonstrado a presença de herpesvírus na patogenia e na etiologia da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* e *Caretta caretta* (QUACKENBUSH et al., 1999, 1998; LACKOVICH et al., 1999).

A partir de 1998, diferentes estudos baseados em análises das sequências gênicas obtidas de tumores provenientes de animais da Flórida e do Havaí, apontam um novo alfa herpesvírus como o provável agente etiológico da fibropapilomatose, sendo denominado FPTHV (herpesvírus associado à fibropapilomatose das tartarugas) (QUACKENBUSH et al., 1998; YU et al., 2001; NIGRO et al., 2004; GREENBLATT et al., 2005), e mais recentemente C-FP-HV (*Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus*) (LACKOVICH et

al., 1999; ENE et al., 2005; HERBST et al., 2008; WORK et al., 2009). Para Herbst e Klein (1995) está claro que o fator etiológico primário em FP é um agente infeccioso. Cabe ressaltar, entretanto, que há um consenso de que a etiologia da doença esteja associada a vários fatores concorrentes e não somente a um agente primário. Sabe-se que a intensa infecção parasitária por trematódeos cardiovasculares debilita severamente o hospedeiro, o que poderia dificultar sua defesa contra a fibropapilomatose (JACOBSON et al., 1991; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997; AGUIRRE et al., 1998).

O papel das doenças na conservação de espécies ameaçadas tem sido apontado com um dos principais riscos a manutenção destas populações. O clássico estudo de Synclair e Norton-Griffiths (1979) no Serengeti aponta como as doenças podem interferir no equilíbrio dos ecossistemas e na estrutura de populações e comunidades, bem como o papel das intervenções humanas no desenvolvimento e aumento da prevalência de doenças. A presença de patógenos é esperada em populações selvagens, mas, em geral, a mortalidade elevada e a redução drástica das populações acometidas por doenças não é comum. Os efeitos são mais deletérios em populações que precisam ser conservadas, particularmente nos casos em que o patógeno circula em áreas amplas e por longo período de tempo, ou quando afeta negativamente a reprodução ou a movimentação normal das espécies acometidas pela doença (CAUGHLEY, SINCLAIR, 1994).

Estudos sobre genética de populações revelaram que os haplótipos mais frequentes em Ubatuba são o CM-A8 e CM-A5. O haplótipo CM-A5 está relacionado aos haplótipos das populações de tartarugas verdes encontradas nas áreas de reprodução do Suriname, da Ilha de Aves na Venezuela e da Costa Rica e o haplótipo CM-A8 está relacionado aos haplótipos das populações de Trindade, Ascensão, Atol das Rocas, Bioko e Guiné Bissau. Em Almofala, os haplótipos mais frequentes são CM-A8, CM-A5 e CM-A3. Além das populações de áreas de reprodução que compõem as áreas de alimentação de Ubatuba, nota-se em Almofala que a presença do haplótipo CM-A3 está relacionada às populações de áreas de reprodução da Costa Rica, onde este haplótipo é encontrado em um maior número de indivíduos estudados nesta população (NARO-MACIEL et al., 2007).

O C-FP-HV esteve presente em 100% das ocorrências naturais e em 100% dos tumores induzidos por inoculação em tartarugas mantidas em cativeiro. Foram identificadas quatro variantes distintas para este alfa-herpesvírus denominadas “A”, “B”, “C” e “D” em três localidades: *Florida west central coast*, *Florida Keys & Bay* e *Indian River Lagoon*. De 49 animais analisados, observou-se uma maior prevalência da variante A (28 animais), que foi encontrada em *C. mydas* das três áreas estudadas e em *C. caretta* da *Florida Keys & Bay*; a

variante “B” apenas em *C. mydas* da área denominada *Indian River Lagoon*, onde 16 das 17 tartarugas verdes analisadas apresentaram resultado positivo; a variante C foi observada em todas as espécies analisadas, sendo *C. mydas* e *C. caretta* de *Florida Keys & Bay* e *L. olivacea* de *Florida west central coast* e a variante “D” em apenas um único espécime de *C. caretta* da área *Florida Keys & Bay*. Há evidências de que o C-FP-HV na Flórida é diferente do que é encontrado no Havaí (ENE et al., 2005). A habilidade do herpesvírus em ser transmitido entre as tartarugas marinhas no oceano é, provavelmente, influenciada pela habilidade deste agente em manter a infecção por longos períodos de tempo no ambiente marinho (CURRY et al., 2000).

Entretanto, além da presença do herpesvírus, há outros fatores que podem contribuir para o aumento da prevalência da doença, tais como desenvolvimento demográfico, atividades industriais e agrônômicas em ambientes próximos às praias, às baías e aos lagos (BALAZS, 1991; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997). Há hipóteses de que poluentes químicos induzam o vírus latente à infecção ou causem imunossupressão, facilitando o desenvolvimento ou persistência da fibropapilomatose. Muitos contaminantes químicos são conhecidos por causarem supressão do sistema imunológico (HERBST; KLEIN, 1995).

Em estudo realizado no Havaí, as formas de uso e ocupação do solo, associadas a 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).

A FP não era registrada no Havaí antes da década de 1950 e apresentou um pico na década de 1990 e seu posterior declínio é puramente especulativo (CHALOUPKA; BALAZS; WORK, 2009). Há duas explanações para estas oscilações: o desenvolvimento de imunidade ao agente etiológico (LLOYD-SMITH et al., 2005 apud CHALOUPKA; BALAZS; WORK, 2009) e/ou a remoção de um agente ambiental indutor de tumores no habitat ao redor da ilha de Molokai (HERBST; KLEIN, 1995).

### **2.3 A utilização de ferramentas científicas para a conservação das tartarugas verdes**

#### 2.3.1 Atividade celular (fagocitose e *burst* oxidativo)

Os mecanismos do sistema imunológico podem ser (1) inespecífico ou natural: com ação rápida, porém inespecífica e (2) específico ou adquirido com ação lenta, porém específica para o antígeno que induziu este tipo de resposta. A imunidade natural é

independente da etiologia da lesão e confere a primeira linha de defesa através da atividade fagocítica e resposta inflamatória. A imunidade adquirida envolve os linfócitos T e B, cujas respostas, celular e humoral respectivamente, são desencadeadas quando há substâncias estranhas no organismo concomitante à resposta natural inflamatória (AZEVEDO; CHASIN, 2004). Em vertebrados ectotérmicos, o sistema imune inato é um componente crucial para a proteção contra infecções microbianas, sendo a fagocitose um importante constituinte (KUMAR, 2011).

Nos organismos aeróbios, as enzimas da cadeia respiratória e do retículo endoplasmático reduzem à água a maior parte do oxigênio molecular ( $O_2$ ) absorvido. Entretanto, cerca de 1 a 3% desse  $O_2$  são parcialmente reduzidos, gerando elementos intermediários reativos denominados espécies reativas de oxigênio (EROs): radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (SIMON-GIAVAROTTI, 2001). Dessa forma, o  $O_2$  pode gerar enorme toxicidade devido a estes intermediários da redução oxidativa (NEWMAN; CLEMENTS, 2008).

Organismos aeróbios têm um sistema de defesa antioxidante responsável por prevenir, neutralizar ou reparar danos induzidos pelas EROs (VALVIDIA et al., 2007). Estudos realizados por Labrada-Martagón et al. (2011) encontraram correlações positivas entre atividade enzimática antioxidante e níveis de peroxidação lipídica com múltiplos componentes químicos, sugerindo a possibilidade de seus usos como biomarcadores de condições ambientais específicas usando a tartaruga verde como sentinela.

As EROs são produzidas pela cadeia de elétrons mitocondrial, após exposição à radiação UVA e UVB, no processo da fagocitose, durante o metabolismo de compostos da dieta, no processo de isquemia-reperfusão e durante a biotransformação de xenobióticos que utilizam o sistema do citocromo P450. Considerando que infecções e tumores são fatores moduladores da atividade do citocromo P450 (FERNÁNDEZ et al., 2011) e que as EROs são um componente importante da resposta imunológica de organismos marinhos expostos a uma variedade de estressores ambientais, incluindo a poluição (LESSER, 2006 apud LABRADA-MARTAGÓN et al., 2011), sua avaliação se torna um indicativo do estado imunológico dos animais.

Os neutrófilos produzem certas EROs como  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$  e  $O_2^{\cdot-}$  (importantes oxidantes microbicidas, mediadores da inflamação e da lesão tecidual) durante o metabolismo de células aeróbicas ou como produto de secreção de fagócitos ativados, resultado de uma sequência de reações bioquímicas de alto consumo de oxigênio conhecidas como *burst* oxidativo (SILVA, 2003). Além dos neutrófilos, os macrófagos também exibem atividade de *burst* oxidativo



como indicador da atividade bactericida e morte tóxica dependente de oxigênio pelos organismos patogênicos. Em carpas (*Cyprinus carpio*) os neutrófilos dos rins exibem uma atividade citotóxica espontânea envolvendo peróxido de hidrogênio que causa lise de células tumorais (PASTORET et al., 1998). Heterófilos também são reconhecidos por exercerem atividade fagocítica e produzirem EROs (CAMPBELL, 2006). Fagócitos (macrófagos) ativados fornecem uma importante contribuição para a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (RUSSO et al., 1989).

A produção de EROs pode ser monitorada quantitativamente por citometria de fluxo com a utilização do reagente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (HASUI et al., 1989). Já foi demonstrado que a oxidação do DCFH-DA é quantitativamente proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio gerado (HIRABAYASHI et al., 1985 apud MASSOCO; CARMONA; BACCARIN, 2006).

A fagocitose é uma importante ferramenta de defesa celular. Durante esse processo, partículas estranhas ligam-se aos receptores específicos da membrana celular do fagócito, acionando uma alteração no citoesqueleto que resulta em extensões da membrana ao redor da partícula (KWIATKOWSKA; SOBOTA 1999 apud ZIMMERMAN et al., 2010). No interior do fagócito e com a ação dos lisossomos, a partícula é finalmente degradada (COICO et al., 2003 apud ZIMMERMAN et al., 2010).

Inúmeros estudos utilizando citometria de fluxo têm sido realizados para avaliar produção de peróxido de hidrogênio e fagocitose (HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989; LEHMANN; SØRNES; HALSTENSEN, 2000). Também têm sido reportadas pesquisas com amostras de quelônios, cujo foco é a atividade celular (ZIMMERMAN et al., 2010) e de seu papel com doenças, como a fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (ROSSI, 2007; ROSSI et al., 2009, 2012, 2013a, 2013c). Além disso, a citometria de fluxo tem sido adaptada e utilizada para estudos que envolvem agentes patogênicos, avaliação de fatores contaminantes, caracterização e mecanismos de imunidade das diferentes células sanguíneas. Sendo assim, tem se desenvolvido estudos para a detecção de *Mycoplasma agassizii* (MOHAMMADPOUR et al., 2010), para a identificação de linfócitos T CD3+ (MUÑOZ et al., 2009) e a avaliação de danos nucleares nas células devido aos poluentes ambientais (MATSON et al., 2005; HAYS; McBEE, 2007).

A análise de fagócitos é muito importante, pois a fagocitose e o *burst* oxidativo dos neutrófilos e macrófagos representa uma sequência de eventos para a morte intracelular de bactérias. A citometria de fluxo representa grande vantagem em relação às técnicas anteriormente utilizadas para a avaliação da capacidade fagocítica, pois é possível discriminar

as populações celulares com maior velocidade e menor quantidade de células. Além disso, concomitantemente à fagocitose é possível medir-se o *burst* oxidativo gerado por estímulos solúveis, bactérias ou fungos. Através da citometria de fluxo o *burst* oxidativo pode ser monitorado quantitativamente (SILVA, 2003). O PMA (miristato-acetato de forbol), considerado um bom indicador do metabolismo celular e atividade bactericida (STOSIK et al., 2002) e o *Staphylococcus aureus* marcado com iodeto de propídeo (SAPI) estimulam os leucócitos polimorfonucleares a formarem e liberarem peróxido de hidrogênio em taxas correlacionadas àquelas associadas com a fagocitose. A mensuração dos níveis de liberação de peróxido de hidrogênio é considerada um parâmetro de avaliação da ativação de fagócitos (SILVA, 2003).

### 2.3.2 Parâmetros hematológicos

A análise do sangue é uma ferramenta amplamente utilizada que permite o monitoramento da saúde do animal e a investigação de processos fisiológicos (CHANSUE, 2011). É capaz de detectar distúrbios como anemias, doenças inflamatórias, parasitemias, desordens hematopoiéticas e disfunções homeostáticas (CAMPBELL, 2006).

A avaliação do estado fisiológico de espécies classificadas em perigo é importante para o desenvolvimento de manejo apropriado e para os planos de conservação (BOLTEN; BJORNDAL, 1992; DIAZ-FIGUEROA, 2005).

As análises hematológicas são úteis para estimar a resposta às doenças ou aos seus tratamentos (CAMPBELL, 2006), fornecendo informações fundamentais para a avaliação de quelônios em reabilitação visando à soltura dos mesmos. Entretanto, algumas vezes a identificação dos leucócitos com base nas diferenças morfológicas não é algo fácil de ser feito, pois linfócitos pequenos podem ser muito similares aos trombócitos (ZHANG; GU; LI, 2011).

Os heterófilos são fagócitos e estão associados aos processos inflamatórios ou lesão tecidual, estresse (excesso de glicocorticoides), neoplasia e leucemia heterófilica (CAMPBELL, 2006).

Eosinófilos são fagócitos particularmente envolvidos em destruição de parasitas. Aumento no número de eosinófilos no sangue está associado a parasitos e estimulação no sistema imune. Em *Chelydra serpentina*, estas células demonstraram atividade fagocítica de imunocomplexos (MEAD; BORYSENKO, 1984).

Apesar da função exata dos basófilos ser desconhecida em répteis, o número reduzido destas células durante a hibernação pode ser indicativo de diminuição da função imune ou uma ausência de resposta antigênica. Por outro lado, é observado aumento de monócitos e azurófilos no período de hibernação (DIAZ-FIGUEROA, 2005).

Os linfócitos desempenham importante papel no sistema imunológico dos répteis, produzindo anticorpos e atacando corpos estranhos (DIAZ-FIGUEROA, 2005). Assim como os das aves e dos mamíferos, estas células apresentam as mesmas classes de linfócitos principais: linfócitos B e T (CAMPBELL, 2006). Além disso, os linfócitos também exercem atividade fagocítica (ZIMMERMAN, 2010).

Monócitos são células fagocíticas, sendo que a monocitose sugere uma doença inflamatória. Frequentemente os monócitos e os heterófilos respondem juntos aos eventos fagocíticos, heterofilia e monocitose foram observadas em *Chelonia mydas* acometidas pela fibropapilomatose (WORK; BALAZS, 1999) e em *Terrapene carolina carolina* com feohifomicose (JOYNER et al., 2006).

### 2.3.3 Poluentes orgânicos de importância ambiental

A sociedade industrializada do século XX gerou a demanda e a oferta crescentes de novos produtos químicos aumentando as quantidades de diversos compostos químicos provenientes das descargas industriais e de várias outras atividades antrópicas. Os compostos orgânicos liberados no meio ambiente possuem tamanhos de moléculas e pertencem a diversos grupos funcionais, sendo que a natureza destes determina a reatividade e a aplicabilidade de tais compostos. As substâncias tóxicas persistentes (STP) reúnem as bifenilas policloradas (PCBs), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH), o hexaclorobenzeno (HCB), o aldrin, o dieldrin, o endrin, o p,p, -DDT, o p,p, -DDE, p,p, -DDD, os hexaclorocicloexanos ( $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH e  $\delta$ -HCH), o endossulfan, o heptacloro e o pentaclorofenol. Incluem, também, compostos orgânicos de metais e têm como características alta hidrofobicidade, baixa reatividade no meio ambiente e grande tendência para se acumular, ou bioconcentrar, nos tecidos dos organismos vivos (SCHWARZENBACH; GSCHWEND; IMBODEN, 1995 apud CENTENO; BISINOTI ; JARDIM, 2007).

O primeiro tratado global para a eliminação das substâncias tóxicas persistentes foi resultado da Convenção de Estocolmo, realizada em 2001. Este tratado selecionou doze substâncias (chamadas como as doze sujas): aldrin, endrin, dieldrin, clordano, DDT, toxafeno, mirex, heptacloro, hexaclorobenzeno, PCBs, dioxinas e furanos. Estas substâncias compõem

uma classe conhecida como Poluentes Orgânicos Persistentes (POP) que juntamente com outras substâncias compõem o grupo mais abrangente das STP. Recentemente, através do projeto implementado pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP) denominado “Avaliação Regional das Substâncias Tóxicas Persistentes”, financiado pelo “Global Environment Facility – GEF”, a situação das STP foi avaliada em todo o mundo. O projeto dividiu o globo em 12 regiões geográficas com o objetivo de gerar uma avaliação, em cada região, dos danos e ameaças causadas por estas substâncias, identificando aquelas mais importantes e preocupantes regionalmente, bem como as prioridades de ações de intervenção e de minimização dos impactos previstos pelas características regionais. O documento da América do Sul foi resultado de um trabalho multidisciplinar que abrangeu oito países: Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Chile, Bolívia, Peru e Equador. As STP selecionadas pelo grupo da América do Sul foram separadas em três grupos: (1) agrotóxicos - no caso dos clorados, os compostos fontes de maior preocupação são: aldrin, dieldrin, endrin, p,p -DDT, p,p- DDE, p,p - DDD, hexaclorociclohexanos ( $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH e  $\delta$ -HCH), endossulfan, heptacloro, clordano; (2) compostos industriais, dentre os quais estão PCBs, dioxinas e furanos, além do hexaclorobenzeno que também está incluído no grupo dos agrotóxicos e (3) subprodutos não intencionais. Os POPs são compostos assim classificados porque satisfazem os critérios de persistência e toxicidade, (CENTENO; BISINOTI; JARDIM, 2007), bioacumulam, são resistentes à degradação fotoquímica, química e biológica, podem ser transportados por longas distâncias no ambiente e são considerados pela UNEP (*United Nations Environment Programme*) como prioritários devido ao seu impacto ao ambiente e à saúde dos seres vivos (Lago, 2006).

Uma vez no ambiente, os organoclorados se distribuem em diferentes compartimentos, tais como material particulado na atmosfera, sedimento, biota, corpos hídricos, entre outros (Lago, 2006). Como consequência de sua afinidade por lipídios e sua lenta biodegradação, tendem a se acumular principalmente em espécies de posição elevada na cadeia alimentar como os mamíferos marinhos (TANABE; TATSUKAWA, 1992 apud LAGO, 2006).

### **2.3.3.1 Relação entre poluentes orgânicos e doenças, incluindo a fibropapilomatose**

Nota-se que a FP aparentemente não é evidente nas tartarugas verdes até que elas se desloquem do oceano aberto a habitats de desenvolvimento neríticos ou costeiras (ENE et al., 2005), sugerindo que a causa da doença está dentro dos habitats de alimentação (CHALOUPKA; BALAZS; WORK, 2009). Quando fazem este deslocamento o hábito

alimentar muda de onívoro à herbívoro. Nos ambientes costeiros (maior disponibilidade de alimento), há uma exposição dos animais a uma maior concentração de poluentes, que pode levar a um aumento da prevalência da doença (BAPTISTOTTE, 2007).

Os poluentes causam efeitos danosos incluindo comprometimento dos aspectos fisiológicos, estresse crônico, comprometimento da função imunológica e aumento na susceptibilidade à doenças (AGUIRRE et al., 1995).

Além da presença do herpesvírus, há outros fatores que podem contribuir para o aumento da prevalência da doença, tais como desenvolvimento demográfico, atividades industriais e agrônômicas em ambientes próximos às praias, às baías e aos lagos (BALAZS, 1991; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997). Entende-se que os poluentes químicos induzam o vírus latente à infecção ou causem imunossupressão, facilitando o desenvolvimento ou persistência da fibropapilomatose (HERBST; KLEIN, 1995).

Estudos realizados em ursos polares (*Ursus maritimus*) reportaram altas concentrações de organoclorados em amostras sanguíneas. Essas concentrações foram fortemente associadas à imunossupressão, implicando que esses animais podem sofrer aumento da suscetibilidade às infecções e riscos para doenças (LIE et al., 2004, 2005; FISK et al., 2005 apud KENDALL et al., 2010). Foi também determinado que focas do porto (*Phoca vitulina*) que consumiram peixes contaminados com organoclorados sofreram redução da atividade de células *natural killer* e da capacidade imune específica, sendo este um dos primeiros registros de imunossupressão como resultado de exposição crônica a poluentes ambientais (KENDALL et al., 2010). Diversos poluentes são capazes de alterar diferentes etapas da resposta imune inata de muitas espécies de peixes (BOLS et al., 2001). Estudos realizados na Carolina do Norte (EUA) com *Caretta caretta* demonstraram que compostos organoclorados se acumulam nos tecidos do animal causando hepatotoxicidade, imunotoxicidade, toxicidade reprodutiva, enfraquecimento e efeitos no comportamento neurológico (KELLER et al., 2004). Estudos sobre a análise de PCBs e DDTs em *Zalophus californianus* (leões marinhos da Califórnia, EUA), com e sem carcinoma, notaram que os animais com a doença apresentaram maior concentração destes organoclorados embora tivessem menor espessura da camada de gordura. Este estudo sugeriu que os PCBs podem desempenhar um papel no desenvolvimento do carcinoma nestes animais (YLITALO et al., 2005).

Alterações ambientais causadas pela poluição têm sido relacionadas com doenças em populações inteiras de peixes e a explicação para esta conexão pode estar no funcionamento do sistema imune inato (AFFONSO, 2006).

### 2.3.3.2 Bifenilas policloradas

As bifenilas policloradas (PCBs) são compostos muito estáveis, sintetizadas inicialmente em 1929 pela *Monsanto Chemical Company* e que em 1966 foram reconhecidas como poluentes ambientais por causa da detecção em amostras de animais selvagens (SALGADO, 2002). Os nomes comerciais variam de acordo com o país, sendo que no Brasil estes compostos são denominados como Ascarel (SILVA, 2009).

As PCBs representam uma família de 209 congêneres, diferentes estruturas, dependendo do número e da posição dos átomos de cloro na estrutura bifenila (Figura 2.6). Cada congêneres possui uma lipofilicidade específica, bem como efeito tóxico e metabolização (O'HARA; RICE, 1996). Os congêneres com maior número de cloros são mais difíceis de serem metabolizados pelo organismo (JORGENSEN; FATH, 2010). A nomenclatura dos congêneres adotada pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) considera a posição dos átomos de cloro na estrutura bifenila.

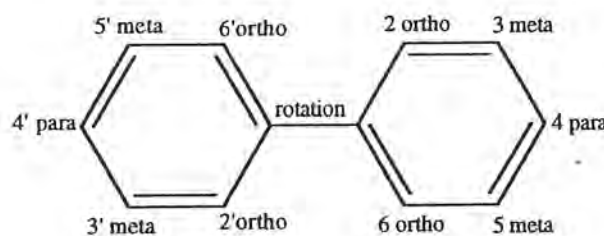


Figura 2.6 – Estrutura básica de uma bifenila policlorada. Fonte: O'HARA; RICE, 1996

Não há registro da produção de PCBs no Brasil, sendo importadas dos EUA e da Alemanha. A Portaria Interministerial 19 (2 de janeiro de 1981) proibiu a fabricação, utilização e comercialização de PCBs em todo o território nacional (SILVA, 2009).

A produção mundial acumulada foi de aproximadamente 1.200.000 toneladas, sendo que deste total 60% foram utilizados em transformadores e capacitadores, 15% para fluidos de transferência de calor e 25% como aditivos na formulação de plastificantes, tintas, adesivos e praguicidas (PENTEADO et al., 2001). Das 1.200.000 toneladas, 4% foram degradadas ou incineradas e 31% atingiram o meio ambiente, além de 65% que ficaram armazenadas nos equipamentos ainda existentes. Este armazenamento ocorre porque apesar das proibições

estabelecidas na década de 1980, os equipamentos instalados ainda podem ficar ativos até o final de suas vidas úteis (CIPRO, 2011).

A exposição aos poluentes orgânicos ocorre através da pele, casca dos ovos, inalação, transferência materna e alimentos contaminados, sendo que a dieta é um importante recurso de exposição especialmente se os compostos forem altamente lipofílicos e persistentes, como é o caso de PCBs (SOLLA, 2010).

Os níveis de PCBs podem ser mais altos em animais mais velhos do que nos juvenis devido ao tempo de exposição e aumento gradual no armazenamento de gordura. Mobilização de gordura durante migrações, desova, inanição, produção de ovos, gestação e lactação proporciona um meio de excreção. Este processo pode aumentar o nível de PCBs sistematicamente disponível e provocar sinais de toxicose (O'HARA; RICE, 1996). A inanição causa a mobilização de compostos lipofílicos acumulados no tecido adiposo e consequentemente ativa sistemas enzimáticos (CORSOLINI; AURIGI; FOCARDI, 2000). No entanto, de um modo geral os animais maiores têm mais capacidade para metabolizar estes compostos do que os menores, variando de acordo com a espécie (diferenças no citocromo P450). Esta enzima promove a hidroxilação do anel resultando em compostos mais hidrossolúveis podendo ser eliminados pelas fezes e urina (JORGENSEN; FATH, 2010).

A bioacumulação é influenciada pelo coeficiente de partição que é uma medida de solubilidade diferencial dos compostos em octanol e água (JORGENSEN; FATH, 2010). No entanto, este coeficiente apenas prediz uma tendência de partição do composto entre água e lipídeo e, assim, a bioacumulação depende também da habilidade do animal assimilar, metabolizar e excretar tais substâncias (SOLLA, 2010).

A exposição a estes poluentes incluem diversas manifestações no organismo, tais como: hepatotoxicidade, imunotoxicidade, problemas reprodutivos e respiratórios, efeitos carcinogênicos e mutagênicos, mudanças no nível hormonal e vias controladoras de hormônios (HANSEN, 1988 apud BOLL et al. 1998).

O estudo de poluentes como PCBs é extremamente importante para pesquisas sobre conservação e saúde das tartarugas marinhas (van de MERWE et al., 2009).

## Referências

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.

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

AGUIRRE, A.A.; LUTZ, P.L. Marine turtles as sentinels of ecosystem health: is fibropapillomatosis an indicator? **EcoHealth**, p. 275-283, v. 1, 2004.

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, 1994.

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. 79-94.

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

AGUIRRE, A.; PEREZ, J. V.; SPRAKER, T. R.; SALDAÑA, P. H.; ZIMMERMAN, B.; PADILLA, E. A.; REYES, E. M. L.; BALAZS, G. H. Studies of marine turtle fibropapillomatosis in Mexico: an international collaboration of research and training. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 20., 2000, Orlando **Proceedings...** Miami: U.S. Department of Commerce- NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-477, 2000. p. 50.

ALMEIDA, P.A.; SANTOS, A.J.B.; THOMÉ, J.C.A.; BELINI, C.; BAPTISTOTTE, C.; MARCOVALDI, M.A.; SANTOS, A.S.; LOPEZ, M. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. **Revista Biodiversidade Brasileira**, Brasília, v.1, n. 1, p. 12-19, 2011. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/revistaeletronica/index.php/BioBR/article/view/87>>. Acesso em: 3 set. 2013.

AZEVEDO; F.A.; CHASIN, A.A.M. (Coord.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Carlos: RiMa; São Paulo: InterTox, 2004. 322 p.

BALAZS, G.H. **Synopsis of biological data on the green turtle in Hawaiian Islands.** Honolulu: U.S. Department of Commerce - NOAA Technical Memorandum NMFS-SWFSC, 7, 1980. 141 p.



\_\_\_\_\_. Current status of fibropapillomas in the Hawaiian green turtle, *Chelonia mydas*. In: BALAZS, G.H., POOLEY, S.G. (Ed.). **Research plan for marine turtle fibropapilloma**. Honolulu: U.S. Department of Commerce- NOAA Technical Memorandum NMFS-SWFSC-156, 1991. p. 47-57.

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

BJORNDAL, K.A. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. In: LUTZ, P.L.; MUSICK, J.A. (Ed.). **The biology of sea turtles**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 199-231.

BOLL, M.; WEBER, L.W.D.B.; MESSNER, B.; STAMPFL, A. Polychlorinated biphenyls affect the activities of gluconeogenic and lipogenic enzymes in rat liver: is there an interference with regulatory hormone actions? **Xenobiotica**, London, v. 28, n. 5, p. 479-492, 1998.

BOLS, N.C.; BRUBACHER, J.L.; GANASSIN, R.C.; LEE, L.E. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 25, p. 853-873, 2001.

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

BOULON Jr, R.H. Reducción de las Amenazas a los huevos y las crías: protección *in situ*. In: ECKERT, K.L.; BJORDNAL, K.A.; ABREU-GROBOIS, F.A.; DONNELLY, M. (Ed.). **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas**. Tradução de R. Breseño-Dueñas e F.A. Abreu-Grobois. Washington: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group, 2000. p. 192-198. (Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación, 4).

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.

BRITO, F.L.C.; MAIA, F.C.L.; DE FRANÇA, L.M.O.; ALBUQUERQUE, A.B.; SANTOS, R.A.M.; CAVALCANTI, M.A.M.; GUIMARÃES, E.S.G. Fibropapillomatosis and multiple fibromas in a green turtle from the South Coast of Pernambuco State, Brazil. **Marine Turtle Newsletter**, Exeter, v. 106, n. 12, p. ???-???, 2004.

BRODERICK, A.C.; FRAUENSTEIN, R.; GLEN, F.; HAYS, G.C.; JACKSON, A.L.; PELEMBE, T.; RUXTON, D.G.; GODLEY, B.J. Are green turtles globally endangered? **Global Ecology and Biogeography**. Oxford, v. 15, n. 1, p. 21-26, 2006.

BUGONI, L.; KRAUSE, L.; PETRY, M.V. Marine debris and human impacts on sea turtles in southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 42, n. 12, p. 1330-1334, 2001.

CAMPBELL, T.W. Hematologia de répteis. In: BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. (Ed.). **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. Tradução de J.J. Fagliari e D.S. Fagliari. São Paulo: Roca, [2006]. p. 248-264.

CAUGHLE, G.; SINCLAIR, A.R.E. **Wildlife Ecology and Management**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 1994. 305 p.

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, 2004.

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.

CHANSUE, N.; SAILASUTA, A.; TANGTRONGPIROS, J.; WANGNAITHAM, S.; ASSAWAWONGKASEM, N. Hematology and clinical chemistry of adult yellow-headed temple turtles (*Hieremys annandalii*) in Thailand. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 40, n. 2, p. 174–184, 2011.

CIPRO, C.V.Z. **Poluentes orgânicos e isótopos estáveis no ecossistema da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártida**. 2011. 238 p. Tese (Doutorado em Oceanografia Química e Geológica) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CORSOLINI, S.; AURIGI, S.; FOCARDI, S. Presence of polychlorobiphenyls (PCBs) and coplanar congeners in the tissues of the Mediterranean loggerhead turtle (*Caretta caretta*). **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 40, n. 11, p. 952-960, 2000.

COSTA, T.E.B.; FRAGOSO, A.B.L; DE ALENCAR, A.E.B; DA COSTA, S.A.G.L; BONFIM, A.C.; SILVA, F.J.L. Fibropapilomatose e tendências espaciais de sua ocorrência em tartarugas-verde, *Chelonia mydas*, encalhadas na Bacia Potiguar, Rio Grande Do Norte, Brasil. In: JORNADA, 6.; REUNIÓN DE CONSERVACIÓN E INVESTIGACIÓN DE TORTUGAS MARINAS EN EL ATLÁNTICO SUR OCCIDENTAL, 7., 2013, Piriápolis, Uruguay. **Resumenes...** Piriápolis: CICMAR- DINARA, 2013, p. 135-139.

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

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

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

DIAZ-FIGUEROA, O. **Characterizing the Health Status of the Louisiana Gopher Tortoise (*Gopherus polyphemus*)**. 2005. 119 p. Thesis (Master of Science in The Interdepartmental Program in Veterinary Medical Sciences) - Agricultural and Mechanical College, Faculty of the Louisiana State University, Baton Rouge, 2005.

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

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

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.

EHRHART, L.M.; SINDLER, R.B.; WITHERINGTON, B.E. **Preliminary investigation of papillomatosis in green turtles: phase I - frequency and effects on turtles in the wild and in captivity**. Orlando: University of Central Florida, 1986. 46 p.

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.

ERNST, C.H.; BARBOUR, R.W. **Turtles of the world**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1989. 313 p.

FERNÁNDEZ, A.G. Generalidades del citocromo P450. In: MOYA, F.B. (Ed.). **Colección docencia universitaria: aspectos fundamentales del citocromo P450**. Madrid: Fundación Tajerina, [2011]. p. 7-32. (Serie Ciencias Biomédicas).

FOLEY, A.M.; SCHROEDER, B.A.; REDLOW, A.E.; FICK-CHILD, K.; TEAS, W. G. Fibropapillomatosis in strand green turtles *Chelonia mydas* from the eastern United States (1980-1998): trends and association with environmental factors. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 41, n. 1, p. 29-41, 2005.

- FRAZIER, J.G. Conserving sea turtles and other natural resources. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 13., 1993, Jekyll Island. **Proceedings...** Miami: U.S. Department of Commerce- NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-341, 1994. p. 60-63.
- GODFREY, M.H.; GODLEY, B.J. Seeing past the red: flawed IUCN global listings for sea turtles. **Endangered Species Research**. 6, p. 155–159, 2008.
- 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.
- GULKO, D.; ECKERT, K. **An ecological guide**. Honolulu: Mutual Publishing, LLC, 2004. 112 p.
- HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 117, p. 53-58, 1989.
- HAYS, K.A.; McBEE, K. Flow cytometric analysis of red-eared slider turtles (*Trachemys scripta*) from tar creek superfund site. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 353–361, 2007.
- 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.; 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.
- HIRAMA, S.; EHRHART, L. M. Prevalence and severity of green turtle fibropapillomatosis in the Indian River Lagoon. **Florida Scientist**, Orlando, v. 62, n. 35, p. 1999.
- HIRTH, H.F. **Synopsis of the biological data on green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758)**. U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report, vol. 97, n. 1, Washington D. C. USA. 1997. 126 p.
- HUERTA, P.; PINEDA, H.; AGUIRRE, A.A.; SPRAKER, T.R.; SARTI, L.; BARRAGAN, A. First confirmed case of fibropapilloma in a leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). In: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 20., 2000, Orlando **Proceedings...** Miami U.S. Department of Commerce- NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-477, 2000. p. 193.

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

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

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

JORGENSEN, S.E.; FATH, B.D. (Ed.). **Ecotoxicology**: a derivative of encyclopedia of ecology. Waltham:Academic Press, 2010. 390 p.

JOYNER, P.H.; SHREVE, A.A.; SPAHR, J.; FOUNTAIN, A.L.; SLEEMAN, J.M. Phaeohyphomycosis in a free-living eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 42, n. 4, p. 883–888, 2006.

KNÖBL, T.; REICHE, L.; MEÑAO, M.C. Fibropapilomatose em tartarugas marinhas. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v. 6, n. 1, p. 64-69, 2011.

KUMAR, S.; RAI, U. Dynorphin regulates the phagocytic activity of splenic phagocytes in wall lizards: involvement of a -opioid receptor-coupled adenylate-cyclase–cAMP–PKA pathway. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 214, p. 4217-4222, 2011.

LABRADA-MARTAGÓN, V.; RODRÍGUEZ, P. A. T.; MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, L. C.; ZENTENO-SAVÍN, T. Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, Oxford, v. 154, p. 65–75, 2011.

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.

LEHMANN, A.K.; SØRNES, S.; HALSTENSEN, A. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 243, p. 229–242, 2000.

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, 1994.

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

LUTZ, P.L. Salt, water and pH balance in sea turtles. In: LUTZ, P.L.; MUSICK, J.A. (Ed.). **The biology of sea turtles**. Boca Raton: CRC Press, 1997. 432 p.

MARCOVALDI, M.A.G.; THOMÉ, C.A. Reducción de las amenazas a las tortugas. In: ECKERT, K.L.; BJORDNAL, K.A.; ABREU-GROBOIS, F.A.; DONNELLY, M. (Ed.). **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas**. Tradução de R. Breseño-Dueñas e F.A. Abreu-Grobois. Washington: IUCN; SSC Marine Turtle Specialist Group, 2000. p. 187-191 (Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación, 4).

MARCOVALDI, M.A.A.G.D.; SANTOS, A.S.; SALES, G. (Org.). *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) In: \_\_\_\_\_. **Plano de Ação Nacional para Conservação das Tartarugas Marinhas**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2001a. pt. 1, p. 30-33. (Série Espécies Ameaçadas, 25).

\_\_\_\_\_. Introdução In: \_\_\_\_\_. **Plano de Ação Nacional para Conservação das Tartarugas Marinhas**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2001b. pt. 1, p. 19-24. (Série Espécies Ameaçadas, 25).

\_\_\_\_\_. Ameaças às tartarugas marinhas In: \_\_\_\_\_. **Plano de Ação Nacional para Conservação das Tartarugas Marinhas**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2001c. pt. 1, p. 48-55. (Série Espécies Ameaçadas, 25).

MARTINS, M.; MOLINA, F.B. Panorama geral dos répteis ameaçados do Brasil In: MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M.; PAGLIA, A.P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008. p. 327-373.

MASSOCO, C.O.; CARMONA, L.; BACCARIN, R.Y.A. Técnica de citometria de fluxo para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pelas células do líquido sinovial de equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 665-667, 2006.

MAST, R.B.; HUTCHINSON, B.J.; HOWGATE, E.; PILCHER, N.J. MTSG update: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group hosts the second Burning Issues Assessment Workshop. **Marine Turtle Newsletter**, Exeter, v. 110, p. 13–15, 2005.

MATSON, C.W.; PALATNIKOV, G.; ISLAMZADEH, A.; McDONALD, T. J.; AUTENRIETH, R. L.; DONNELLY, K. C.; BICKHAM, J. W. Chromosomal damage in two species of aquatic turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremys caspica*) Inhabiting Contaminated Sites in Azerbaijan. **Ecotoxicology**, p. 513–525, 2005.

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

MATUSHIMA, E.R.; LONGATTO-FILHO, A.; DI LORETTO, C.; KANAMURA, C.T.; GALLO, B.; BAPTISTOTTE, C. Cutaneous papillomas of green turtles: a morphological and immunohistochemical study in brazilian specimens. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE CONSERVATION AND BIOLOGY, 19., 1999, South Padre Island **Proceedings...** Miami U.S. Department of Commerce- NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC - 443, 2000. p. 237–239.

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

MEAD, K.F.; BORYSENKO, M. Surface immunoglobulin on granular and agranular leukocytes in the thymus and spleen of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 8, n. 1, p. 109–120, 1984.

MEHNERT, D.U.; MONEZI, T.A.; MÜLLER, N.G.; COSTA, S.M.; BATLOUNI, S.R.; BORELLA, M.I.; HÁRSI, C.M.; CANDEIAS, J.M.G.; BAPTISTOTTE, C.; MATUSHIMA, E.R. Estudo etiológico de Fibropapilomatose de tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas*. I. Pesquisa de agentes virais. (Apresentação oral). In: CONGRESSO, 5.; ENCONTRO ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS 10., 2001, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ABRAVAS, 2001.

MEYLAN, A.B.; MEYLAN, P.A. Introducción a la evolución, historias de vida y biología de las tortugas marinas. In: ECKERT, K.L.; BJORDNAL, K.A.; ABREU-GROBOIS, F.A.; DONNELLY, M. (Ed.). **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas**. Tradução de R. Breseño-Dueñas e F.A. Abreu-Grobois. Washington: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group, 2000. p. 3-5. (Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación, 4).

MOHAMMADPOUR, H.A.; TRACY, C.R.; REDELMAN, D.; DuPRE, S.A.; HUNTER, K.W. Flow cytometric method for quantifying viable *Mycoplasma agassizii*, an agent of upper respiratory tract disease in the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 50, p. 347–351, 2010.

MONEZI, T.A.; MULLER, N.M.G.; MATUSHIMA, E.R.; ROSSI, S.; RONDON, M.; MEHNERT, D.U. Detecção de herpesvírus em tumor e sangue de tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas* mantidas na base do projeto Tamar, Ubatuba-SP, nos anos de 2005 e 2006. In: CONGRESSO, 10.; ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 15., 2006, São Pedro. **Anais...** São Pedro: ABRAVAS, 2006. p. 21.

MORTIMER, J.A. Feeding ecology of sea turtles. In: BJORNDAL, K.A. (Ed.). **Biology and conservation of sea turtles**. Washington: Smithsonian Institute Press, 1982. p. 103-109.

MUÑOZ, F.A.; ESTRADA-PARRA, S.; ROMERO-ROJAS, A.; WORK, T.M., GONZALEZ-BALLESTEROS, E.; ESTRADA-GARCIA, I. Identification of CD3+ T lymphocytes in the green turtle *Chelonia mydas*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 131, n. 3/4, p. 211-217, 2009.

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 (*Chelonya mydas*) of Brazil. **Journal of Heredity**, Washington, v. 97. p. 29-39, 2007.

NEWMAN, M.C.; CLEMENTS, W.H. **Ecotoxicology: a comprehensive treatment**. Boca Raton: CRC Press; Taylor & Francis Group, 2008. 852 p.

NIGRO, O.; YU, G.; AGUIRRE, A.A.; LU, Y. Sequencing and characterization of the full-length gene encoding the single-stranded DNA binding protein of a novel *Chelonian* herpesvirus. **Archives of Virology**, New York, v. 149, p. 337-347, 2004.

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

O'HARA, T.M.; RICE, C.D. Polychlorinated biphenyls. In: FAIRBROTHER, A.; LOCKE, L.N.; HOFF, G.L. (Ed.). **Noninfectious Diseases of Wildlife**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Manson Publishing, [1996]. p. 71-86.

ORAVETZ, C.A. Reducción de la captura incidental en pesquerías. In: ECKERT, K.L.; BJORDNAL, K.A.; ABREU-GROBOIS, F.A.; DONNELLY, M. (Ed.). **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas**. Tradução R. Breseño-Dueñas e F.A. Abreu-Grobois. Washington: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group, 2000. p. 217-224. (Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación, 4).

PASTORET, P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.; GOVAERTS, A. (Ed.). **Handbook of vertebrate immunology**. Waltham: Academic Press, 1998. 673 p.

PENTEADO, J.C.P.; VAZ, J.M. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 390-398, 2001.

PLOTKIN, P. Adult migration and habitat uses. In: LUTZ, P.L.; MUSICK, J.A. (Ed.). **The biology of sea turtles**. Boca Raton: CRC Press, 2003. v. 2, 472 p.

PRITCHARD, P.C.H.; MORTIMER, J.A. Taxonomía, morfología externa e identificación de las especies. In: ECKERT, K.L.; BJORDNAL, K.A.; ABREU-GROBOIS, F.A.; DONNELLY, M. (Ed.). **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas**. Tradução R. Breseño-Dueñas e F.A. Abreu-Grobois. Washington: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group, 2000. p. 23-44.

ROSSI, S. **Estudo do impacto da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758) (Testudines, Cheloniidae)**. 2007. 104 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ROSSI, S.; ZWARG, T.; SANCHEZ, T.C.; CESAR, M.O.; WERNECK, M.R.; MATUSHIMA, E.R. Hematological profile of *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) according to the severity of fibropapillomatosis or its absence. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, Rio de Janeiro v. 29, n. 12, p. 974-978, 2009a.

ROSSI, S.; SÁ-ROCHA, V.M.; KINOSHITA, D.; GENOY-PUERTO, A.; ZWARG, T. WERNECK, M.R.; SÁ-ROCHA, L.C.; MATUSHIMA, E.R. Flow cytometry as a tool in the evaluation of blood leukocyte function in *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Cheloniidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n. 3, p. 899-905, 2009b.



ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; VALE, L.A.S.; GENOY-PUERTO, E.A.; KINOSHITA, D.; HAZARBASSANOV, N.G.T.Q.; BECKER, J.H.; MATUSHIMA, E.R. Contributions of flow cytometry and gas chromatography for conservation of *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) in Brazil. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE REABILITAÇÃO DE FAUNA MARINHA, 2., 2012, Rio Grande. **Resumos...** Rio Grande: CRAM-Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG-Aiuká, 2012a. p. 160.

ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G.; BAPTISTOTTE, C.; LIMA, E.H.S.M.; BECKER, J.H.; MATUSHIMA, E.R. Establecimiento de escores para determinar el grado de severidad de la fibropapilomatosis en *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) capturadas en la costa brasileira. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE REABILITAÇÃO DE FAUNA MARINHA, 2., 2012, Rio Grande. **Resumos...** Rio Grande: CRAM-Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG-Aiuká, 2012b. p. 161.

ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G.; MATUSHIMA, E.R. A proposal to objectively classify fibropapillomatosis severity in sea turtles considering number and size of tumors. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLES BIOLOGY AND CONSERVATION, 33., 2013, Baltimore. **Abstracts...** Miami: U.S. Department of Commerce- NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-645, 2013a. p. 27.

ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; HAZARBASSANOV, N.G.T.Q.; GENOY-PUERTO, E.A.; KINOSHITA, D.; MATUSHIMA, E.R. Immunosuppression Evaluation of *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) Caught in Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLES BIOLOGY AND CONSERVATION, 33., 2013, Baltimore. **Abstracts...** Miami: U.S. Department of Commerce-NOAA Technical Memorandum-NMFS-SEFSC-645,2013b. p. 26.

ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; VANSTREELS, R.E.T.; HAZARBASSANOV, N.G.T.Q.; MATUSHIMA, E.R. Correlations between Leukocytes Activity, Hematological Parameters and Fibropapillomatosis Index of *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) Caught in Brazil. In: REUNIÃO DA SESSÃO WILDLIFE DISEASES ASSOCIATION (WDA) AMÉRICA LATINA, 1., 2013, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: WDA Latin America 2013c. p. 39-40.

ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; VALE, L.A.S.; MONTEIRO, S.H.; PRIOSTE, F.E.S.; VILCA, F.Z.; TORNISIELO, V.L.; MATUSHIMA, E.R. Possible Relation between Polychlorinated Biphenyls and Fibropapillomatosis in *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae). In: REUNIÃO DA SESSÃO WILDLIFE DISEASES ASSOCIATION (WDA) AMÉRICA LATINA, 1., 2013, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: WDA Latin America 2013d. p. 127-128

ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; VALE, L.A.S.; MONTEIRO, S.H.; PRIOSTE, F.E.S.; TORNISIELO, V.L.; MATUSHIMA, E.R. A Importância do monitoramento de bifenilas policloradas em sangue de *Chelonia mydas* e as implicações para sua conservação. In: JORNADA, 6.; REUNIÓN DE CONSERVACIÓN E INVESTIGACIÓN DE TORTUGAS MARINAS EN EL ATLÁNTICO SUR OCCIDENTAL, 7., 2013, Piriápolis. **Resumenes...** Piriápolis: CICMAR- DINARA 2013e. p. 96-100.

RUSSO, M.; TEIXEIRA, H. C.; MARCONDES, M. C.; BARBUTO, J. A. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **Ribeirão Preto**, n. 22, v. 10, p. 1271-1273, 1989.

SALGADO, P.E.T. Bifenilas policloradas. In: FERNÍCOLA, N.A.G.G.; OLIVEIRA, S.S. (Org.). **Poluentes orgânicos persistentes**. 2002. p. 65-105. (Cadernos de Referência Ambiental, 13).

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M. **Determinação de pesticidas organoclorados em tecidos de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) provenientes da costa sudeste do Brasil: estudo da ocorrência em animais com e sem fibropapilomatose**. 2013. 124 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; ROSSI, S.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G.; MARIGO, J.; BERTOZZI, C.P.; MATUSHIMA, E.R. Body condition index of *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) with and without fibropapillomatosis along the coast of Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 33., 2013, Baltimore. **Abstracts...** Miami: U.S. Department of Commerce-NOAA Technical Memorandum-NMFS-SEFSC-645, 2013a. p. 29.

\_\_\_\_\_. La fibropapilomatosis puede afectar la condición corporal de tortugas verdes (*Chelonia mydas*) o vice-versa? In: REUNIÃO DA SESSÃO WILDLIFE DISEASES ASSOCIATION (WDA) AMÉRICA LATINA, 1., 2013, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: WDA Latin America, 2013b. p. 43-44.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; ROSSI, S.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R. G., BAPTISTOTTE, C.; BECKER, J.H.; LIMA, E.H.S.M.; MATUSHIMA, E. R. Distribución anatómica de fibropapilomas en tortugas verdes, *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae), capturadas en la costa brasileira. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE REABILITAÇÃO DE FAUNA MARINHA, 2., 2012, Rio Grande. **Resumos...** Rio Grande: CRAM-Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG-Aiuká, 2012a. p. 163

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; ROSSI, S.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G.; MARIGO, J.; BERTOZZI, C.P.; BAPTISTOTTE, C.; BECKER, J.H.; MATUSHIMA, E.R. Comparison between corporal subjective classification and body condition index (BCI) for *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) caught in Brazilian coast. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE REABILITAÇÃO DE FAUNA MARINHA, 2., 2012, Rio Grande. **Resumos...** Rio Grande: CRAM-Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG-Aiuká, 2012b. p. 162.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; ROSSI, S.; VILCA, F.Z.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G.; MARIGO, J.; BERTOZZI, C.P.; TORNISIELO, V.L.; MATUSHIMA, E.R. Serian los pesticidas organoclorados cofactores asociados a la ocurrencia de fibropapilomatosis en tortugas verdes (*Chelonia mydas*)? In: REUNIÃO DA SESSÃO WILDLIFE DISEASES ASSOCIATION (WDA) AMÉRICA LATINA, 1., 2013, São Paulo. **Resumos...** São Paulo Latin America, 2013c. p. 41-42.

SANTOS, R.G. dos; MARTINS, A.S.; FARIAS, J.N.; HORTA, P.A.; PINHEIRO, H.T.; TOREZANI, E.; BAPTISTOTTE, C.; SEMINOFF, J.A.; BALAZS, G.H.; WORK, T.M.

Coastal habitat degradation and green sea turtle diets in Southeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, London 2011.

SEMINOFF, J.A.; JONES, T.T.; RESENDIZ, A.; NICHOLS, W.J.; CHALOUPKA, M.Y. Monitoring green sea turtles (*Chelonia mydas*) at a coastal foraging area in Baja California, Mexico: multiple indices to describe populations status. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Cambridge, n. 83, p. 1355-1362, 2003.

SILVA, F.R. **Efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos de ratos avaliados por citometria de fluxo**. 2003. 179 p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SILVA, J.D. **Ocorrência de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em tartarugas marinhas *Chelonia mydas***. 2009. 69 p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Química e Geológica) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SIMON-GIAVAROTTI, K.A. **Estudo de estresse oxidativo hepático induzido por lindano em um modelo de hipertireoidismo experimental**. 2001. 159 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

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

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.

SOLLA, S.R. Organic contaminants in reptiles. In: SPARLING, D.W.; LINDER, G.; BISHOP, C.A.; KREST, S.K. (Ed.). **Ecotoxicology of amphibians and reptiles**. 2<sup>nd</sup> ed. SETAC, CRC Press - Taylor & Francis Group, [2010]. p. 289-324.

SPOTILA, J.R. **Sea turtles: a complete guide to their biology, behaviour and conservation**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2004. 227 p.

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

TAGLIOLATTO, A.; GUIMARÃES, S.; VIDAL, A.; MONTEIRO, C.; LOBO-HAJDU, G.; GITIRANA, H. Evidência fotográfica de regressão de fibropapilomas em tartarugas-verdes *Chelonia mydas* em Itaipu, Rio de Janeiro, Brasil. In: JORNADA, 6.; REUNIÓN DE CONSERVACIÓN E INVESTIGACIÓN DE TORTUGAS MARINAS EN EL ATLÁNTICO SUR OCCIDENTAL (ASO), 7., 2013, Piriápolis. **Resúmenes...** Piriápolis: CICMAR-DINARA, 2013. p. 72-76.

TAPIA, A.C. **Evaluación histopatológica de las etiologías comunes y asociadas a fibropapiloma en la tortuga prieta (*Chelonia mydas agassizii*) de Bahía Magdalena, Baja California Sur, México**. 2004. 94 p. Tesis (Doctorado) – Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, La Paz, 2004.

VALDIVIA, P.A.; ZENTENO-SAVÍN, T.; GARDNER, S.C.; AGUIRRE, A.A. Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizii*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, Oxford, v. 146, p. 111–117, 2007.

Van DEVANTER, D.R.; WARRENER, P.; BENNET, L.; SCHULTZ, E.R.; COUTER, S.; GARBER, R.L.; ROSE, T.M. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 7, p. 1666-1671, 1996.

van de MERWE, J.P.; HODGE, M.; WHITTIER, J.M.; LEE, S.Y. Analysing persistente organic pollutants in eggs, blood and tissue of the green sea turtle (*Chelonia mydas*) using gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 393, p. 1719-1731, 2009.

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

VASCONCELOS, J.; ALBAVERA, E.; LOPEZ, E.M.; HERNANDEZ, P.; PEÑAFLORES, C. First assessment on tumors incidence in nesting females of olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea*, at La Escobilla Beach, Oaxaca, Mexico. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE CONSERVATION AND BIOLOGY, 18., 1998, Mazatlán. **Proceedings...** Miami: U.S. Department of Commerce- NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC- 436, 2000.p. 276-278.

WALLACE; B.P.; DIMATTEO, A.D.; BOLTEN, A.B.; CHALOUPKA, M.Y.; HUTCHINSON, B.J.; ABREU-GROBOIS, F.A.; MORTIMER, J.A.; SEMINOFF, J.A.; AMOROCHO, D.; BJORNDALE, K.A.; BOURJEA, J.; BOWEN, B.W.; DUEÑAS, R.B.; CASALE, P.; CHOUDHURY, B.C.; COSTA, A.; DUTTON, P.H.; FALLABRINO, A.; FINKBEINER, E.M.; GIRARD, A.; GIRONDOT, M.; HAMANN, M.; HURLEY, B.J.; LÓPEZ-MENDILAHARSU, M.; MARCOVALDI, M.A.; MUSICK, J.A.; NEL, R.; PILCHER, N.J.; TROËNG, S.; WITHERINGTON, B.; MAST, R.B. Global conservation priorities for marine turtles. **PLoS ONE**. 6, n. 9, p. 1-14, 2011.

WITHERINGTON, B.E. Reducción de las amenazas al hábitat de anidación. In: ECKERT, K.L.; BJORNDALE, K.A.; ABREU-GROBOIS, F.A.; DONNELLY, M. (Ed.). **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas**. Tradução de R. Breseño-Dueñas e F.A. Abreu-Grobois. Washington: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group, 2000. p. 204-210. (Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación, 4).

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, n. 4, p. 804-807, Oct. 1999.

\_\_\_\_\_. Causes of green turtle (*Chelonia mydas*) morbidity and mortality in Hawaii. In: ANNUAL SYMPOSIUM IN THE SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 17., 1997, Orlando. **Proceedings...** Miami: U.S. Department of Commerce- NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-415, 1998. p. 316-317.

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

WORK, T.M.; BALAZS, G.H.; RAMEYER, R.A.; CHANG, S.P.; BERESTECKY, J. Assessing humoral and cell-mediated immune response in Hawaiian green turtles, *Chelonia mydas*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 74, p. 179-194, 2000.

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.

YLITALO, G.M; STEIN, J.E.; HOM, T.; JOHNSON, L.L.; TILBURY, K.L.; HALL, A.J.; ROWLES, T.; GREIG, D.; LOWENSTINE, L.J.; GULLAND, F.M.D. The role of organochlorines in cancer-associated mortality in California sea lions (*Zalophus californianus*). **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 50, p. 30–39, 2005.

ZIMMERMAN, L.M.; VOGEL, L.A.; EDWARDS, K.A.; BOWDEN, R.M. Phagocytic B cells in a reptile. **Biology Letters**, London, v. 6, p. 270-273, 2010.

ZWARG, T.; ROSSI, S.; SANCHES, T.C.; ZIMOVSKI, I.M.; CASAGRANDE, R.A.; CESAR, M.O.; WERNECK, M.R.; MATUSHIMA, E.R. Avaliação do perfil hematológico de tartaruga verde (*Chelonia mydas*) (Testudines, Cheloniidae) com e sem fibropapilomatose do litoral norte do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO, 10.; ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 15., 2006, São Pedro. **Anais...** São Pedro: ABRAVAS, 2006, p. 35.

### 3 ANÁLISE DE BIOMETRIA E FIBROPAPILOMAS DE TARTARUGAS VERDES, *Chelonia mydas* (TESTUDINES, CHELONIIDAE) (LINNAEUS 1758), CAPTURADAS EM DIFERENTES ÁREAS DO BRASIL

#### Resumo

A tartaruga verde (*Chelonia mydas*) é uma tartaruga marinha que utiliza diversas áreas do litoral brasileiro, ilhas e atóis para alimentação e nidificação. Esta espécie muda seu hábito alimentar após um período inicial de vida, retornando às áreas costeiras onde encontra uma variedade de algas e plantas aquáticas (base da sua dieta). Muitas tartarugas verdes têm sido acometidas por uma doença denominada fibropapilomatose (FP), caracterizada por tumores cutâneos benignos e considerada uma importante ameaça à sua sobrevivência. A causa é ainda pouco esclarecida, mas há o consenso de que seja multifatorial com o envolvimento de um herpesvírus (*Chelonid Fibropapilloma-associated Herpesvirus*), fatores ambientais e genéticos. Foram estudadas 133 tartarugas verdes (56 com FP e 77 não acometidas) provenientes de Florianópolis/SC, Ubatuba/SP, Vitória/ES e Almofala/CE (áreas de alimentação) e de Fernando de Noronha/PE (área mista). Foram obtidos dados de biometria (comprimento curvilíneo da carapaça-CCC, massa corporal-MC e índice de condição corporal-ICC), tamanho (de acordo com categorias A, B, C and D), quantidade e localização anatômica dos tumores. Os objetivos foram (1) estudar tartarugas verdes provenientes de diversas localidades e (2) desenvolver uma nova proposta de escore para estabelecer o grau de severidade da FP. Houve diferenças no CCC entre tartarugas sem tumores de acordo com a área de estudo, na MC e no ICC entre animais acometidos ou não capturados em Ubatuba. Foram quantificados e classificados 1033 tumores de 50 animais, sendo que a quantidade por tartaruga variou de 1 a 61 e a maioria foi encontrada na região anterior (669 tumores). Análises sobre o tamanho dos tumores registraram que 446 foram classificados na categoria A, 520 na categoria B e poucos tumores foram incluídos nas categorias C e D (62 e 5 respectivamente). Foi desenvolvida uma nova proposta para classificar a FP de acordo com sua severidade que resultou em três escores (FPS): leve, moderado e severo. A maior parte das tartarugas verdes estudadas foi classificada no grau “leve” (N=34) e não houve diferenças nas correlações entre FPS e dados biométricos. Esta proposta poderá ser aplicada para correlacionar a severidade da FP com outras variáveis relacionadas à saúde e ao ambiente, com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre as manifestações regionais desta doença e suas implicações para a conservação das tartarugas marinhas.

Palavras-chave: Tartaruga verde; Dados biomFibropapiloma; Escore; Grau de severidade

#### Abstract

The green sea turtle (*Chelonia mydas*) uses many areas of Brazilian coast, islands and atolls for feeding and nesting. This species changes its feeding habit after an initial period of life, turn back to the coastal areas where finds variety of algae and aquatic plants (base of its diet). Many green sea turtles have been affected by a disease called fibropapillomatosis (FP), characterized by benign skin tumors and considered an important threat to their survival. The cause is still unclear, but there is a consensus that it is multifactorial with involvement of Chelonid Fibropapilloma-associated Herpesvirus, environmental and genetic factors. Were studied 133 green sea turtles (56 with FP e 77 non-affected) caught in Florianópolis/SC,

Ubatuba/SP, Vitória/ES and Almofala/CE (feeding areas) and de Fernando de Noronha/PE (feeding and nesting area). Biometric data were obtained (curved carapace length-CCL, body mass-BM and body condition index-BCI); size (according categories A, B, C and D), numbers and anatomical distribution of tumors, which was used to establish FP scores (FPS). The aims were (1) to study green sea turtles caught in different areas and (2) to development a new proposal of score for establishing the severity of FP. There were differences in CCL between non-affected turtles according to the study area, in BM and BCI between green sea turtles with and without FP caught in Ubatuba. Were quantified and classified 1033 tumors of 50 animals, the number of tumors in each turtle ranged from 1 to 61 and the most part of them was found in anterior region (669 tumors). Analyzes about size of tumors reported 446 classified as category A, 520 tumors as category B and few tumors were included in categories C and D (62 and 5 respectively). Was developed a new proposal to classify FP according to its severity resulting in three scores (FPS): mild, moderate and severe. Most part of green sea turtles studied was classified as “mild” (N=34) and there were not differences in correlations between FPS and biometric data. This proposal will can be applied to correlate the severity of FP with other health and environmental variables in order to increase knowledge of the regional manifestations of this disease and its implications for the conservation of marine turtles.

Keywords: Green sea turtle; Biometric data; Fibropapilloma; Score; Severity

### 3.1 Introdução

A tartaruga verde apresenta ampla distribuição sendo encontrada em mares tropicais e subtropicais. É considerada a espécie de tartaruga marinha que apresenta hábitos mais costeiros, utilizando inclusive estuários de rios e lagos (HIRTH, 1997).

Migram extensivamente através das áreas de alimentação e nidificação, alimentando-se de algas e plantas aquáticas e há observações de tartarugas verdes predando moluscos, peixes, poliquetas e águas-vivas (SPOTILA, 2004).

Sua história natural, assim como a das demais espécies de tartarugas marinhas, é difícil de ser estudada por causa dos deslocamentos e das migrações entre os habitats de alimentação e reprodução (BOWEN, 1992). As áreas de alimentação costeiras são consideradas “habitats de desenvolvimento”, locais onde são vistas tartarugas verdes imaturas. Os deslocamentos entre estas áreas estão relacionados com tamanhos bem definidos e as recapturas podem ser frequentes na mesma área ao longo de vários anos sugerindo uma certa residência nesses locais por um período de tempo (MEYLAN; MEYLAN, 2000).

As tartarugas verdes são animais solitários, mas podem se agregar em locais de alimentação com abundância de recursos alimentares (FAO, 1990).

A espécie *C. mydas* atinge a maturidade sexual mais tarde que as demais espécies de tartarugas marinhas. Isso ocorre por causa do crescimento mais lento devido à sua dieta herbívora (CHALOUPKA et al., 2004).

No Brasil a tartaruga verde desova na Ilha da Trindade/ES, Reserva Biológica do Atol das Rocas/RN e Arquipélago de Fernando de Noronha/PE. Entretanto, há áreas consideradas secundárias nas quais são também registradas desovas.

Há inúmeras ameaças à sobrevivência das tartarugas marinhas, tais como: destruição de habitats, desenvolvimento costeiro, poluição ambiental, ações antrópicas nas praias, consumo de carne e ovos, atividades pesqueiras, alterações climáticas e doenças como a fibropapilomatose (FP) (BUGONI; KRAUSE; PETRY; 2001; WITHERINGTON, 2000; MAST et al., 2005; MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011). Entretanto, a captura incidental é reconhecida como fator de alta mortalidade para as tartarugas marinhas (ORAVETZ, 2000).

O primeiro registro de FP no Brasil ocorreu em 1986 no litoral do estado do Espírito Santo e a prevalência para este país foi registrada em 15,41% segundo dados de 2000 a 2005. Não há registro de fibropapilomatose nas áreas de desova: Arquipélago de Fernando de Noronha (PE), Ilha da Trindade (ES) e Atol das Rocas (RN) (BAPTISTOTTE, 2007).

Considerando as ameaças anteriormente listadas e o fato de que a FP é uma doença com distribuição mundial, cuja prevalência pode variar de 0 a 92% dependendo da região analisada, a conservação destes quelônios torna-se um desafio constante e crescente.

Devido ao fato da causa da FP ainda não ser totalmente elucidada, foi desenvolvida uma avaliação do grau de severidade da doença classificada de acordo com escores. Propostas anteriores já foram realizadas, mas não puderam ser aplicadas aos animais capturados no Brasil, pois o padrão da doença é diferente ao redor do mundo. Com a aplicação dos escores, a doença pode ser classificada de acordo com sua severidade e estas categorizações poderão ser utilizadas em outros estudos.

## **3.2 Desenvolvimento**

### **3.2.1 Áreas de estudo e métodos de captura das tartarugas**

Foram utilizadas amostras de tartarugas verdes provenientes de cinco regiões brasileiras: Ubatuba (SP), Almofala (CE), Vitória (ES), Florianópolis (SC) e Fernando de Noronha (PE). A figura 3.1 representa as regiões onde foram efetuadas as coletas de dados.



Os espécimes de *Chelonia mydas* foram capturados de diversas formas, de acordo com o monitoramento realizado pelas equipes do Projeto TAMAR-ICMBio: (A) captura incidental em Almofala/CE e Florianópolis/SC e (B) captura intencional por tarrafa em Vitória/ES e mergulho ou monitoramento de fêmeas adultas em Fernando de Noronha/PE.

Muitas tartarugas verdes foram capturadas incidentalmente ou resgatadas em Ubatuba/SP, São Sebastião/SP e Angra dos Reis/RJ, sendo encaminhadas ao Centro de Reabilitação do Projeto TAMAR/ICMBio base de Ubatuba/SP. Desta forma, as tartarugas provenientes destas regiões foram agrupadas apenas na localidade “Ubatuba”, visando uma melhor organização destes dados para análise.

Alguns animais foram mantidos nos centros de reabilitação nas bases do Projeto TAMAR/ICMBio de Ubatuba/SP e de Florianópolis/SC, devido ao fato de estarem debilitadas. Essas tartarugas foram soltas após o período de recuperação. Os animais capturados em Almofala/CE, Vitória/ES e Fernando de Noronha (PE) foram soltos logo após a obtenção dos dados biométricos e dos referentes aos fibropapilomas.



Figura 3.1 – Áreas de estudo para obtenção das amostras sanguíneas. Mapa editado por Ralph E. T. Vanstreels

Ubatuba/SP, Florianópolis/SC, Almofala/CE e Vitória/ES representam áreas de alimentação da espécie *Chelonia mydas*. Fernando de Noronha é uma área mista onde tartarugas verdes se reproduzem e se alimentam e não há registro de animais com tumores desde o início do monitoramento do Projeto TAMAR-ICMBio em 1984.

Em Florianópolis/SC (27°42'15''S 48°29'03.99''W) o Projeto TAMAR/ICMBio registra encalhes e monitora as pescas costeiras, principalmente os cercos flutuantes. É uma área importante de ocorrência de tartarugas marinhas provenientes de diferentes populações do Atlântico Sul (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011).

O litoral norte do Estado de São Paulo, região na qual Ubatuba está localizada, é caracterizado por diversas pequenas praias intercaladas por amplos costões rochosos, além de ilhas e é reconhecido como importante área de alimentação e refúgio de tartarugas marinhas (GALLO et al., 2006; SAZIMA; SAZIMA, 1983; FAO, 1990). Em Ubatuba/SP (23°26'S 45°05'W) a área de monitoramento do Projeto TAMAR/ICMBio concentra-se entre a divisa com Paraty/RJ ao norte e o município de Caraguatatuba/SP ao sul, totalizando 106 km de extensão, onde são distribuídas 73 praias aproximadamente (BAPTISTTOTE, 2007), região reconhecida como importante área de alimentação (GALLO et al., 2000 apud SILVA, 2009). Na região também são registradas ocorrências de *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata* e *Dermochelys coriacea* (tartaruga de couro), sendo raros os casos de encalhe de *Lepidochelys olivacea* (GALLO et al., 2000 apud MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011).

Em Vitória/ES (20°24'28''S 040°10'44''W) as capturas foram realizadas na Companhia Siderúrgica ArcelorMittal Tubarão, município de Serra localizado a 10 km de Vitória (TOREZANI, 2010). Nesse local a equipe do Projeto TAMAR/ICMBio realiza monitoramento semanal das tartarugas verdes que usam a saída de efluentes da companhia como área de alimentação.

Almofala/CE (02°50'S 40°09'W) é município de Itarema e fica localizada a 242 km de Fortaleza. A área de monitoramento do Projeto TAMAR/ICMBio envolve 40 km de praias (BAPTISTTOTE, 2007). É uma região que concentra atividade pesqueira artesanal, com pouco fluxo turístico e representa importante área de alimentação da tartaruga verde, havendo ocorrência também das espécies *C. caretta* (tartaruga cabeçuda), *L. olivacea* (tartaruga oliva) e *E.imbricata* (tartaruga de pente).

Fernando de Noronha/PE (03°51'00''S 32°24'W) é uma ilha de origem vulcânica localizada a 345 km a oeste de Cabo São Roque/RN e a 545 km de Recife/PE. É composta por 21 ilhas, ilhotas de rochedos totalizando uma área de 2600 ha e abriga duas Unidades de Conservação Federais: uma Área de Proteção Ambiental (APA) criada em 1986 e um Parque

Nacional Marinho criado em 1988. É considerada uma área de alimentação para *C. mydas* e *E. imbricata* e possui a menor população de tartarugas verdes que desova nas ilhas oceânicas brasileiras, resultado de séculos de predação (mais de 480 anos) (BAPTISTTOTE, 2007).

Os métodos de captura dos espécimes encaminhados ao Centro de Reabilitação na base do Projeto TAMAR-ICMBio em Ubatuba/SP foram diversos: rede de espera de superfície, cerco flutuante, boiando, anzol, mergulho, encalhe de praia e rede de arrasto de camarão. Em Almofala/CE as capturas foram feitas em curral (Figura 3.2A), em Vitória/ES foram realizadas por tarrafa na Companhia Siderúrgica ArcelorMittal Tubarão (Figura 3.2B), em Florianópolis/SC ocorreu em cerco flutuante e em Fernando de Noronha (PE) foram realizadas por mergulho na área de alimentação monitorada (no caso das juvenis) (Figura 3.2C) e obtidas durante o monitoramento na área de desova após a conclusão do ninho e antes do retorno ao mar (no caso das adultas) (Figura 3.2D).



(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 3.2 – Métodos de captura registrados para as tartarugas verdes estudadas. (A) Curral utilizado pelos pescadores em Almofala/CE, (B) Tarrafa utilizada na Arcelor em Vitória/ES, (C) Captura por mergulho na Baía do Sueste, Fernando de Noronha/PE e (D) Monitoramento de adulta durante a desova na Praia do Leão em Fernando de Noronha/PE. Fotos: Silmara Rossi e Angélica M. S. Sarmiento

### 3.2.2 Coleta de dados biométricos e análises dos fibropapilomas

Para a obtenção dos dados de biometria e contagem dos tumores foi necessária apenas contenção física das tartarugas.

Os dados biométricos coletados foram: comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), largura curvilínea da carapaça (LCC) e massa corpórea (MC) (Figura 3.3) de cada animal. Os dados de CCC e MC foram usados para calcular o índice de condição corporal (ICC), um indicador preciso que pode ser usado como parte da rotina de avaliação do estado de saúde das tartarugas verdes (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2012a, 2013).

O valor do ICC foi obtido a partir do cálculo:  $ICC = MC \text{ (kg)}/CCC^3$ . O CCC também foi convertido em comprimento retilíneo da carapaça (CRC) através da aplicação da regressão linear:  $CCC = 1,0363 \times CRC + 2,246$  (SEMINOFF et al., 2003). Esta conversão foi aplicada para que fosse possível fazer comparações com os dados da literatura que utilizaram as medidas retilíneas.



(A)



(B)

Figura 3.3 – Coleta de dados biométricos: (A) comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) e (B) massa corporal (MC). Fotos: Silmara Rossi

Foram também anotadas ausência ou presença dos fibropapilomas visíveis, quantidade, tamanho e localização dos mesmos. A análise dos fibropapilomas levou em consideração as regiões anatômicas afetadas nas tartarugas (Figura 3.4), de acordo com estudos realizados por Sánchez-Sarmiento et al. (2012b) adaptando o protocolo usado pelo Projeto Tamar-ICMBio (ANEXO A). Além disso, os fibropapilomas foram classificados de

acordo com o tamanho, considerando a classificação empregada por Work e Balazs (1999): A (<1cm), B (1cm≤FP≤4cm), C (4cm<FP≤10cm) e D (>10cm).

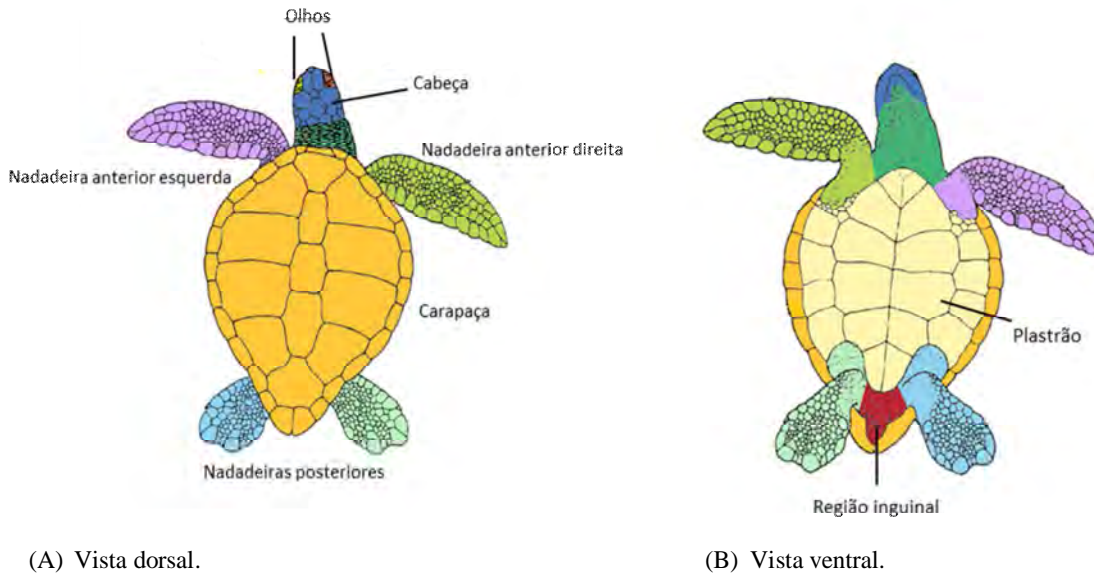


Figura 3.4 – Regiões anatômicas definidas para a análise dos fibropapilomas. Figuras adaptadas de Pritchard e Mortimer (2000) com edição de Silmara Rossi, Ralph E. T. Vanstreels e Angélica M. S. Sarmiento

Com o objetivo de aprimorar as análises dos tumores foi desenvolvida uma avaliação do grau de severidade da doença, cuja classificação se baseou em escores. Estudos similares já foram desenvolvidos: Balazs (1991) propôs escores para o grau de severidade da fibropapilomatose e posteriormente Wood e Wood (1993) também utilizaram escores para severidade da doença, mas consideraram apenas o tamanho dos tumores. Work e Balazs (1999) realizaram estudos relacionando escores de severidade com perfil hematológico de *C. mydas* (com e sem tumores) capturadas no Havaí. No Brasil, estudos relacionaram perfil hematológico de espécimes de *C. mydas* (afetadas ou não pela fibropapilomatose) capturados em Ubatuba/SP, com a severidade da doença considerando a área (cm<sup>2</sup>) de fibropapilomas por tartaruga (ROSSI, 2007; ROSSI et al., 2009).

A necessidade de uma proposta que reflita as condições dos animais estudados no Brasil surgiu devido à dificuldade de se aplicar a proposta dos autores acima citados para as tartarugas capturadas na costa brasileira. O número de tumores em cada categoria de tamanho foi usado para calcular o índice de fibropapilomatose (FPI), aplicando um modelo estatístico utilizando essas categorias e uma pontuação para cada uma delas que resultou na equação (1), na qual  $FP_x$  é o número de tumores de cada categoria de tamanho que foi quantificada em cada indivíduo (ROSSI et al., 2012, 2013).

$$\text{FPI} = (1 \times \text{FP}_A) + (2 \times \text{FP}_B) + (4 \times \text{FP}_C) + (8 \times \text{FP}_D) \quad (1)$$

Esse resultado permitiu classificar o grau de severidade da doença ou escore da fibropapilomatose (FPS – *fibropapillomatosis score*) em três grupos: (1) “leve” ( $\text{FPI} < 50$ ), (2) “moderado” ( $50 \leq \text{FPI} < 100$ ) e (3) “severo” ( $\text{FPI} \geq 100$ ) (ROSSI et al., 2013).

### 3.2.3 Análises estatísticas

Para as análises dos dados biométricos, aplicou-se o teste de normalidade Anderson-Darling. Não havendo normalidade, foram utilizados os testes Mann-Whitney para comparar animais com e sem tumores e Kruskal-Wallis na comparação entre as diferentes regiões estudadas.

Os dados relativos aos fibropapilomas tiveram sua normalidade verificada pelo teste Anderson-Darling e todas as análises realizadas pelo teste Kruskal-Wallis.

## 3.3 Resultados e Discussão

### 3.3.1 Animais estudados e procedência

De agosto de 2010 a abril de 2013 foram colhidas amostras sanguíneas de 133 tartarugas verdes, sendo 77 sem tumores e 56 com fibropapilomas.

A tabela 3.1 contém o número de tartarugas verdes com e sem tumor capturadas nas diferentes áreas de coleta de dados. Em Fernando de Noronha/PE e Florianópolis/SC não houve captura de tartarugas acometidas, nas demais áreas de coleta foram capturados animais sem e com fibropapilomas (Figuras 3.5 A e B respectivamente).

Tabela 3.1 – Número de tartarugas verdes, com e sem fibropapilomas, capturadas por área de estudo no período de ago/2010 a abr/2013

Procedência	Número de <i>C. mydas</i> sem fibropapilomas	Número de <i>C. mydas</i> com fibropapilomas	Total
Ubatuba/SP	26	41	67
Almofala/CE	9	3	12
Efluente final da Arcelor Mittal em Vitória/ES	13	12	25
Florianópolis/SC	3	0	3
Fernando de Noronha/PE	26	0	26
<b>Total</b>	<b>77</b>	<b>56</b>	<b>133</b>

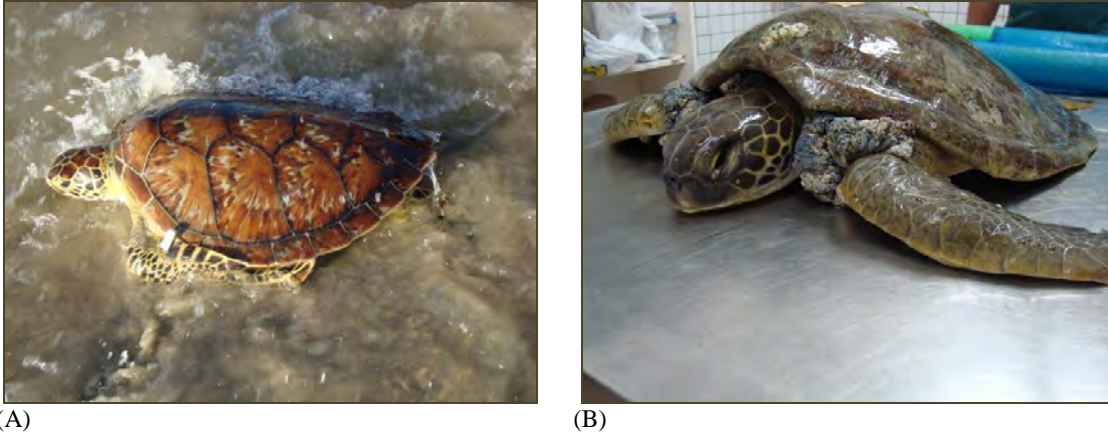


Figura 3.5 – Tartarugas verdes amostradas. (A) *Chelonia mydas* sem tumores após sua captura incidental em curral de Almofala/CE. (B) *Chelonia mydas* com fibropapilomas mantida no Centro de Reabilitação do Projeto TAMAR-ICMBio base de Ubatuba/SP. Fotos: Silmara Rossi

As coletas em Ubatuba/SP (UBA) foram realizadas no período de agosto/2010 a abril/2013 (totalizando 13 viagens). Foram efetuadas duas viagens para Almofala/CE (ALM), uma em janeiro de 2011 e outra em julho de 2011. Em Vitória/ES (VIT) a coleta foi realizada em setembro e outubro de 2011, em Florianópolis/SC (FLO) em novembro de 2011 e em Fernando de Noronha/PE (FN) em março de 2012 e maio de 2013.

As tartarugas recebidas no Centro de Reabilitação da base do Projeto TAMAR-ICMBio em Ubatuba/SP (CReab-UBA) foram capturadas de diversas formas, sendo que a maioria foi por rede de espera de superfície (N=24), seguida por indivíduos encontrados boiando (N=15) (Figura 3.6). Apenas dois animais não tiveram método de captura determinado. Testes estatísticos (*Chi-Square*) revelaram que o método de captura de acordo com a forma de pesca utilizada na região não influenciou a captura de animais com e sem tumores.

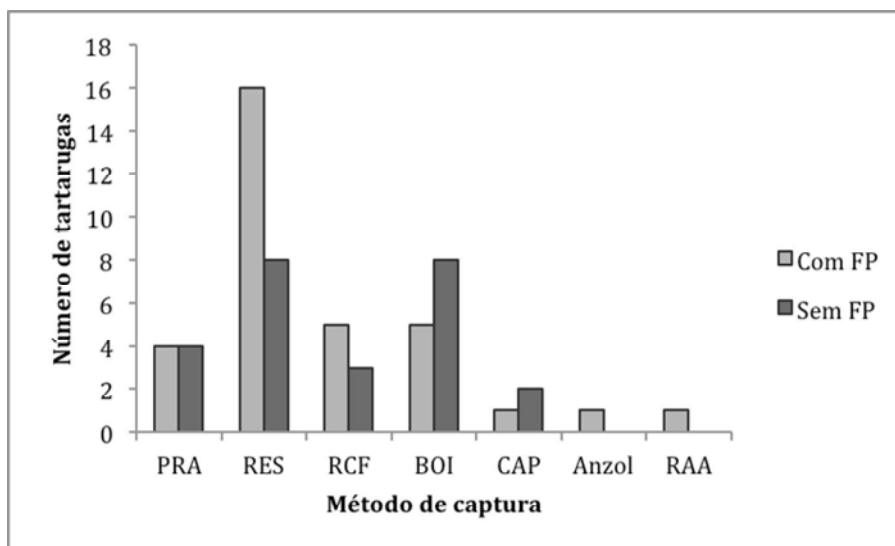


Figura 3.6 – Número de tartarugas verdes capturadas de acordo com os métodos utilizados em UbatubaSP  
 Nota: PRA: encalhe de praia; RES: rede de espera de superfície; RCF: rede de cerco flutuante; BOI: boiando;  
 CAP: captura intencional (mergulho) e RAA: rede de arrasto de camarão  
 FP: Fibropapilomatose

### 3.3.2 Biometria

#### 3.3.2.1 Comprimento curvilíneo da carapaça

De acordo com o teste de normalidade Anderson-Darling, o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) dos animais não apresentou distribuição normal ( $P < 0,005$ ), tanto para tartarugas sem tumores quanto para as acometidas. Dessa forma, foi aplicado o teste Mann-Whitney para comparar animais com e sem tumores e Kruskal-Wallis na comparação entre as diferentes regiões estudadas (Figura 3.7). Entretanto, O CCC médio também foi analisado para ser comparado com dados presentes na literatura.

Todos os animais estudados eram juvenis, com exceção de uma fêmea adulta encontrada durante oviposição na Praia do Leão em Fernando de Noronha/PE.



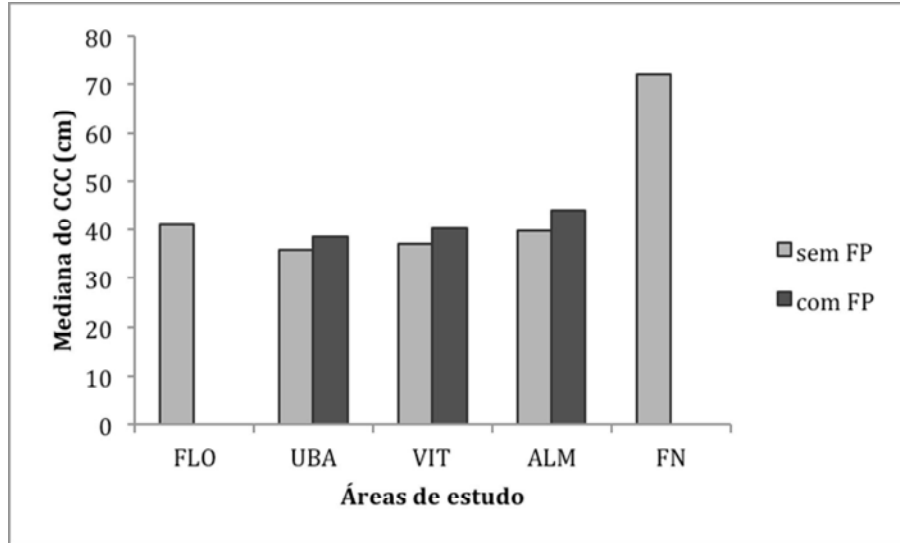


Figura 3.7 – Mediana do comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) de *Chelonia mydas* com e sem fibropapilomatose (FP) de acordo com a área de estudo

Nota: FLO: Florianópolis/SC, UBA: Ubatuba/SP, VIT: Vitória/ES, ALM: Almofala/CE e FN: Fernando de Noronha/PE

Foram analisadas as médias e desvio padrão, bem como os valores mínimo e máximo do CCC das tartarugas estudadas em cada área de estudo. Além disso, optou-se por utilizar as medianas e quartis devido ao fato de os valores não apresentarem distribuição normal. As tartarugas estudadas sem fibropapilomas (N=77) tiveram comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) entre 27,5 cm (espécime mantido no CREab-UBA) e 101 cm (fêmea encontrada durante atividade de nidificação na Praia do Leão, em Fernando de Noronha/PE), com média igual a 50,2 cm. Indivíduos acometidos apresentaram tamanho entre 31 cm (espécime capturado em Vitória/ES) e 64,7 (proveniente de Almofala/CE), média igual a 41,8 cm (N=56) (Tabela 3.2). Baptistotte (2007) analisou o banco de dados do Projeto Tamar-ICMbio no período entre 2000 e 2005 e verificou que a média de CCC para animais não acometidos foi de 45,65 cm (N=7.071) e para tartarugas com FP foi de 47,87 cm (N=1.288). Estudos de Santos (2009) na baía do Espírito Santo/ES, incluindo 163 indivíduos analisados, registraram CCC médio de  $42,1 \pm 6,2$ cm.

Tabela 3.2 – Valores obtidos na análise do comprimento curvilíneo da carapaça (cm) das tartarugas verdes, com e sem tumores, capturadas nos locais estudados

Locais	Fibropapilomatose (FP)	N	Valores				
			Mínimo	Máximo	Média e desvio padrão	Mediana	Q1;Q3
FLO	Sem FP	3	37,5	47,3	42 ± 5	41,1	37,5; 47,3
UBA	Sem FP	26	27,5	81,3	39,1 ± 11,7	35,9	33; 39,6
	Com FP	41	31,5	62	41,5 ± 7,8	38,5	36,2; 44
VIT	Sem FP	13	33,3	47,2	38,3 ± 4	37	35,6; 42
	Com FP	12	31	51	41 ± 5,7	40,3	37,6; 45,8
ALM	Sem FP	9	36,5	49,1	42,1 ± 5,1	39,9	37,7; 47,2
	Com FP	3	41,2	64,7	50 ± 12,8	44	41,2; 64,7
FN	Sem FP	26	43,6	101	70,9 ± 11,8	72	65,8; 78,5

Nota: FLO: Florianópolis/SC, UBA: Ubatuba/SP, VIT: Vitória/ES, ALM: Almofala/CE e FN: Fernando de Noronha/PE

No período de agosto de 2005 a novembro de 2006 foram realizados estudos com amostras sanguíneas de tartarugas verdes capturadas em UBA. Os resultados obtidos revelaram CCC médio igual a  $44,5 \pm 9,4$  cm para animais acometidos (N=29) e  $38 \pm 4,8$  cm para os indivíduos sem fibropapilomas (N=18) (ROSSI, 2007). Valores similares foram obtidos ao se realizar a biometria dos animais estudados nesta mesma região no período entre agosto de 2010 e abril de 2013.

O teste Mann-Whitney demonstrou que não houve diferença entre o CCC de animais com e sem FP capturados em UBA (P=0,0301, W = 1563), VIT (P = 0,1827; W=181) e ALM (P=0,3552; W=25). No entanto, houve diferença (P=0) ao comparar tartarugas sem FP entre as cinco áreas estudadas (N=77), devido ao CCC mediano dos animais capturados em FN, porém, não houve diferença (P=0,229) ao comparar os animais acometidos (N=56) entre as três áreas de ocorrência de FP (Figura 3.8).

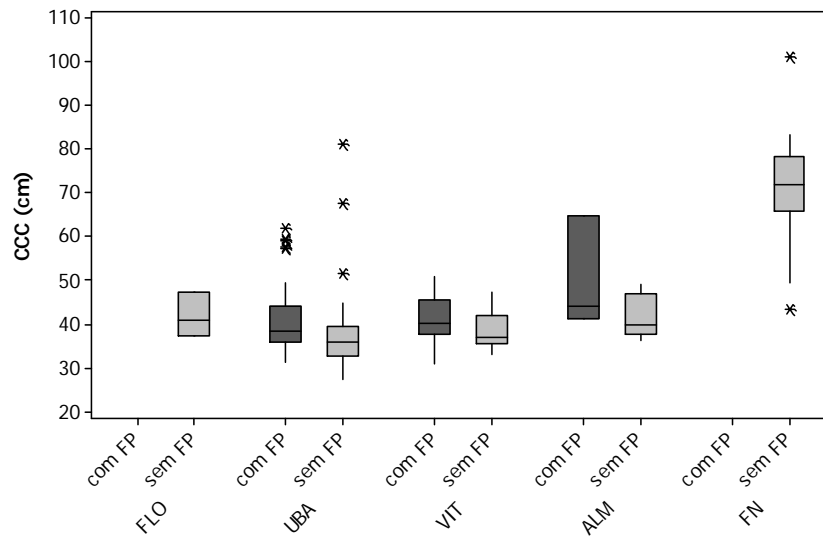


Figura 3.8 – Boxplot do comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) de tartarugas verdes, com e sem fibropapilomatose (FP), amostradas nas diferentes áreas de estudo  
 Nota: FLO-Florianópolis/SC; UBA-Ubatuba/SP; VIT-Vitória/ES; ALM-Almofala/CE e FN-Fernando de Noronha/PE

Com o objetivo de analisar melhor os animais acometidos e não acometidos, os resultados de CCC também foram agrupados nos seguintes intervalos: 20-29,9; 30-39,9; 40-49,9; 50-59,9; 60-69,9; 70-79,9; 80-89,9; 90-99,9 e 100-109,9 cm. Foram observados animais em todos os intervalos, exceto 90-99,9 cm. Maior quantidade de animais foi agrupada nos intervalos 30-39,9 (n=35), 40-49,9 (n=14) e 70-79,9 cm (N=11) (Figura 3.9). Os animais acometidos, procedentes de VIT e UBA, foram agrupados em maior número nos intervalos 30-39,9 e 40-49,9 cm (29 e 21 tartarugas respectivamente). Animais estudados com CCC acima de 70 cm e abaixo de 29,9 cm não apresentaram tumores em nenhuma região amostrada (Figura 3.10).

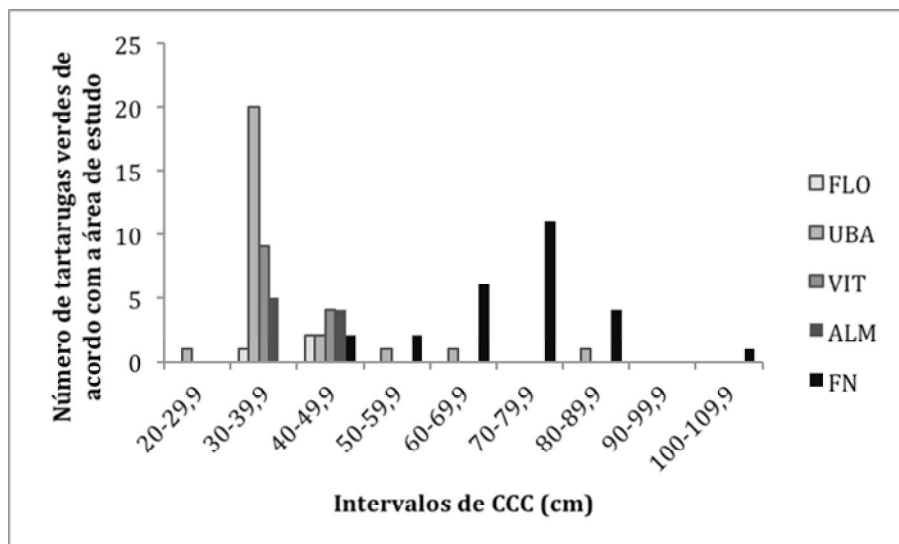


Figura 3.9 – Número de tartarugas verdes sem tumores de acordo com intervalos de comprimento curvilíneo de carapaça (CCC) nas regiões amostradas

Nota: FLO=Florianópolis, UBA=Ubatuba, VIT=Vitória, ALM=Almofala e FN=Fernando de Noronha

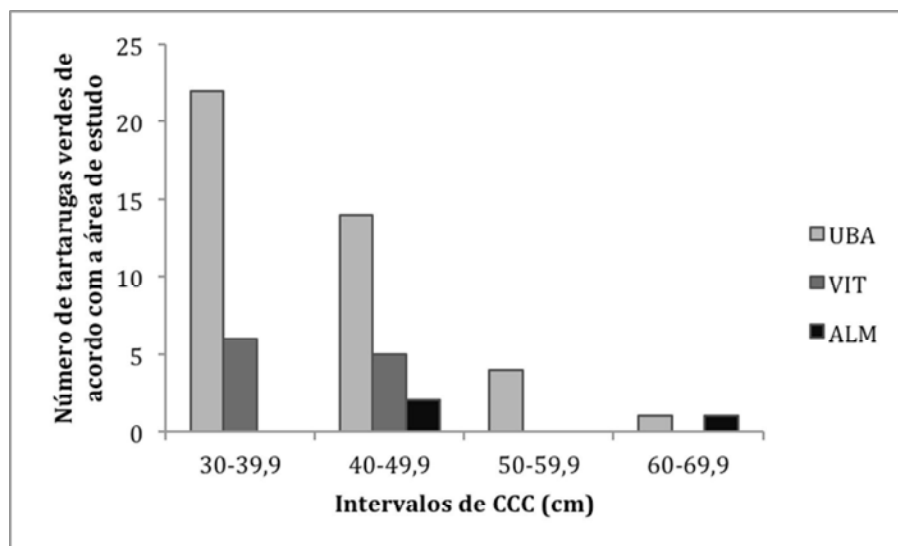


Figura 3.10 – Número de tartarugas verdes com tumores de acordo com intervalos de comprimento curvilíneo de carapaça (CCC) nas regiões amostradas

Nota: UBA=Ubatuba, VIT=Vitória e ALM=Almofala

Os resultados de CCC agrupados em intervalos demonstraram que a maioria dos animais estudados foi agrupada nas categorias 30-39,9 cm (N=35), seguida pelos grupos 40-49,9 (N=14) e 70-79,9 cm (N=11). Provavelmente os dados distribuíram-se desta forma devido ao fato de se tratar de animais capturados em área de alimentação, com exceção de FN que é considerada uma área mista na qual foram encontrados juvenis com média de CCC=70,9 e fêmeas adultas em fase de desova. O banco de dados do Projeto Tamar-ICMBio

analisado nos anos de 2000 a 2005 revelou dados importantes sobre a quantidade de tartarugas verdes com tumores classificadas de acordo com categorias de CCC: 27,5% dos animais foram agrupadas na categoria 70-79,9, seguida por 22,6% na categoria 40-49,9 cm, 21,2% no grupo 50-59,9 cm, 17,2% no grupo 60-69,9 cm e 16,2% na categoria 80-89,9 cm. Apenas 7,4% dos animais foram agrupados na categoria 30-39,9 cm, seguido por 4,3 na categoria 90-99,9 cm, 2,79% no grupo 100-109 cm e por fim 1,7% na categoria 110-119 cm (BAPTISTOTTE, 2007).

Como foram encontrados resultados de CRC na literatura, também foi aplicada a conversão dos valores curvilíneos para retilíneos (ANEXO B). Animais sem tumores provenientes de ALM tiveram média semelhante ( $38,5 \pm 4,9$ ) aos de FLO ( $38,3 \pm 4,8$ ), maior que de UBA ( $35,6 \pm 11,3$ ) e VIT ( $34,8 \pm 3,8$ ) e menor que de FN ( $66,2 \pm 11,4$ ). Estudos de Seminoff et al. (2003) sobre monitoramento de tartarugas verdes em uma área de forrageamento denominada *Bahia de los Angeles* (costa oeste da Península de *Baja California*, México) apresentaram CRC entre 46 e 100 cm ( $74,3 \pm 0,7$  cm, N=200, grupo I) e entre 48,5 e 104,3 cm ( $80,9 \pm 0,8$  cm, N=200, grupo II). Estes dois grupos foram classificados de acordo com o tamanho médio de nidificação (*mean nesting size* – MNS) das fêmeas de Colola/Michoacan, México ( $77,3$ , N=718; FIGUEROA et al., 1993), considerada a primeira fonte de ninhos para a região estudada, com base em evidências genéticas. Dessa forma, no grupo I foram incluídas as que apresentaram CRC médio  $<$  MNS e as classificadas no grupo II tiveram CRC médio  $\geq$  MNS (provavelmente adultas).

### 3.3.2.2 Massa corporal

Com exceção para as tartarugas capturadas em FN, nas outras regiões houve coleta de outro dado biométrico importante: a massa corporal (MC). Um animal capturado em ALM não teve sua MC determinada devido a problemas técnicos durante o trabalho de campo e coleta de dados.

O teste de normalidade Anderson-Darling demonstrou que a MC não apresentou distribuição normal, tanto para tartarugas sem tumores quanto para as acometidas. Sendo assim, os valores foram submetidos ao teste Mann-Whitney para comparar animais com e sem tumores e Kruskal-Wallis na comparação entre as diferentes regiões estudadas.

Assim como os valores obtidos de CCC, a MC também foi analisada de acordo com média e desvio padrão juntamente com valores mínimo e máximo, além da mediana e quartis. (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Valores obtidos na análise da massa corporal (kg) das tartarugas com e sem tumores capturadas nos locais estudados

Locais	Fibropapilomatose (FP)	N	Valores				
			Mínimo	Máximo	Média e desvio padrão	Mediana	Q1;Q3
FLO	Sem FP	3	6,5	13,5	9,5 ± 3,6	8,5	6,5; 13,5
UBA	Sem FP	26	2	36,5	7 ± 8	4,3	3,4; 7
	Com FP	41	4	30	9,1 ± 6,2	7	5,3; 10,3
VIT	Sem FP	13	3,6	11,5	6,1 ± 2,1	5,4	4,9; 7,4
	Com FP	12	2,6	13,3	7,4 ± 2,8	6,7	5,9; 9,6
ALM	Sem FP	9	5	14	8,6 ± 3,3	7	5,5; 11,8
	Com FP	3	7,3	10	8,6 ± 1,9	8,6	

Nota: FLO=Florianópolis, UBA=Ubatuba, VIT=Vitória e ALM=Almofala

Estudos de Seminoff et al. (2003) verificaram que a MC média das tartarugas verdes capturadas (sem tumores; N=200) foi de  $62,3 \pm 1,8$  kg variando entre 14,5 e 145,5 kg. Dados obtidos em estudos na região de UBA demonstraram MC variando entre 4 e 17 kg ( $6,5 \pm 3,2$  cm) para espécimes não acometidos (N=18) e entre 3 e 35 kg ( $10,9 \pm 7,7$  kg) para tartarugas com FP (N=29) (ROSSI, 2007). Estudos de Santos (2009) com um total de 163 indivíduos analisados após captura no litoral do Espírito Santo registraram MC média de  $9,6 \pm 4,9$  kg.

Houve diferença entre animais acometidos e não acometidos capturados em UBA ( $P=0,0006$ ;  $W=1660$ ), porém não houve diferença entre animais acometidos e não acometidos capturados em VIT ( $P=0,1343$ ;  $W=184$ ) e em ALM ( $P=0,7225$ ;  $W=14$ ). Também não houve diferença ( $P=0,013$ ) ao comparar tartarugas sem FP entre as quatro áreas (N=51) nas quais houve possibilidade de obter a MC dos animais capturados, nem ao comparar os animais acometidos entre as três áreas de ocorrência de FP ( $P=0,601$ ; N=55) (Figura 3.11).

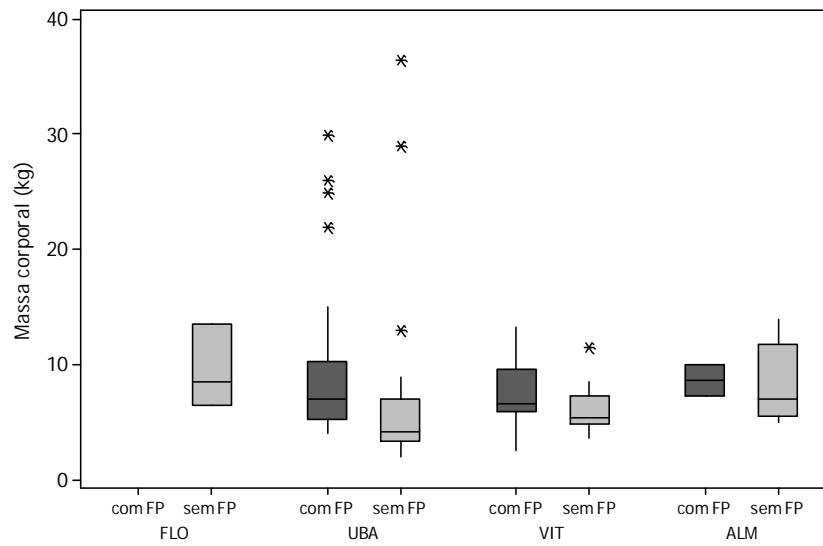


Figura 3.11 – Boxplot da massa corporal de tartarugas verdes, com e sem fibropapilomatose (FP), amostradas nas diferentes áreas de estudo

Nota: FLO-Florianópolis/SC; UBA-Ubatuba/SP; VIT-Vitória/ES e ALM-Almofala/CE

### 3.3.2.3 Índice de condição corporal

O cálculo do índice de condição corporal (ICC) foi extremamente importante, pois representa um escore corporal objetivo sendo mais confiável como indicador da condição corpórea do animal. Estudos realizados por Sánchez-Sarmiento et al. (2012a) indicaram que a classificação subjetiva (com base apenas na observação do aspecto físico da tartaruga) é confiável para animais classificados na categoria “ruim”, porém não é clara no que se refere a indivíduos estimados como “regular” ou “bom”.

Segundo o teste de normalidade Anderson-Darling, o ICC não apresentou distribuição normal. Por isso os dados foram tratados de acordo com o teste Mann-Whitney para comparar animais com e sem tumores e Kruskal-Wallis na comparação entre as diferentes regiões estudadas.

O ICC também foi analisado de acordo com média e desvio padrão juntamente com valores mínimo e máximo, além da mediana e quartis (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Valores obtidos na análise do índice de condição corporal ( $10^{-4}$ ) das tartarugas com e sem tumores capturadas nos locais estudados

Locais	Fibropapilomatose (FP)	N	Valores				
			Mínimo	Máximo	Média e desvio padrão	Mediana	Q1;Q3
FLO	Sem FP	3	1,22	1,28	1,24 ± 0,03	1,23	1,22; 1,28
UBA	Sem FP	26	0,58	1,48	0,96 ± 0,18	0,95	0,83; 1,10
	Com FP	41	0,66	1,46	1,16 ± 0,18	1,20	1,03; 1,25
VIT	Sem FP	13	0,96	1,21	1,06 ± 0,08	1,07	1; 1,12
	Com FP	12	0,87	1,17	1,03 ± 0,10	1,03	0,92; 1,12
ALM	Sem FP	9	0,93	1,29	1,10 ± 0,13	1,10	0,98; 1,24
	Com FP	3	1,04	1,17	1,11 ± 0,10	1,11	

Nota: UBA=Ubatuba, VIT=Vitória e ALM=Almofala

Seminoff et al. (2003) verificaram que na *Bahia de los Angeles* as tartarugas verdes analisadas tiveram valores de ICC entre 1,03 e 2,19 ( $1,42 \pm 0,015$ ; N = 102).

Houve diferença comparando animais com e sem FP capturados em UBA (P=0,0000; W=1725). Por outro lado, não houve diferença entre animais com e sem FP capturados em VIT (P=0,6438; W=147) e em ALM (P=0,9062; W=13). Não houve diferença (P=0,008) ao comparar tartarugas sem FP entre as quatro áreas (N=51), nas quais houve possibilidade de obter a MC dos animais capturados. As tartarugas capturadas em UBA apresentaram o menor valor mediano em comparação às demais. Também não houve diferença (P=0,021) ao comparar os animais acometidos (N=55) entre as três áreas de ocorrência de FP (Figura 3.12).

Como não foi possível determinar a MC dos espécimes estudados em FN, não há valores do ICC para os animais desta região.

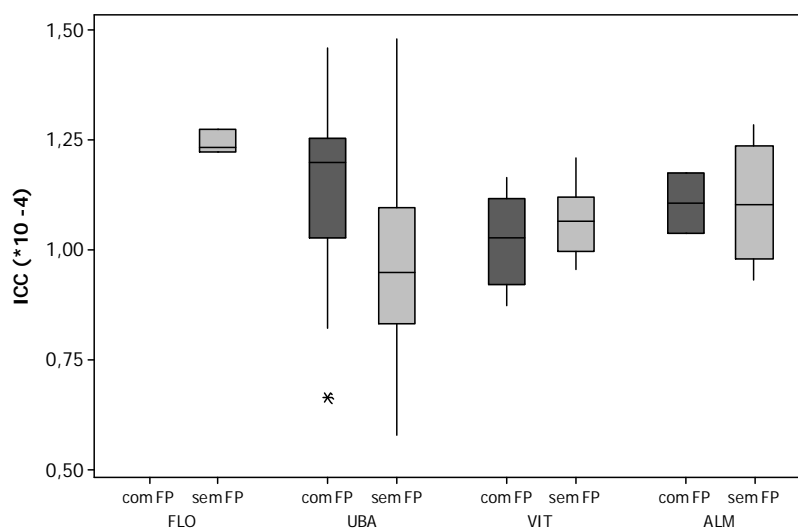


Figura 3.12 – Boxplot do índice de condição corporal (ICC) de tartarugas verdes, com e sem fibropapilomatose (FP), amostradas nas diferentes áreas de estudo

Nota: FLO-Florianópolis/SC; UBA-Ubatuba/SP; VIT-Vitória/ES e ALM-Almofala/CE



### 3.3.3 Análise dos fibropapilomas

Foram quantificados e classificados 1.033 fibropapilomas de 50 animais. A análise destes dados, relacionando o número de tartarugas de acordo com a quantidade de tumores classificados em categorias, demonstrou que 21 tartarugas tinham de um a dez fibropapilomas e apenas um animal (capturado em ALM) apresentou 61 tumores (Figura 3.13). Não foi possível fazer essa análise em seis animais mantidos no centro de reabilitação da base de Ubatuba/SP, pois os tumores já haviam sido removidos antes do dia da colheita de sangue.

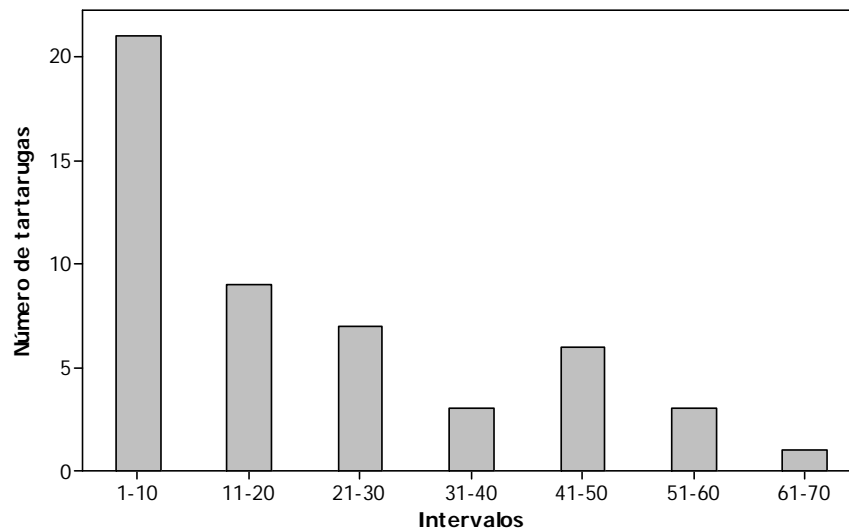


Figura 3.13 – Número de tartarugas verdes de acordo com quantidade de tumores

A frequência de tumores por região anatômica foi variada (Figura 3.14), sendo maior na região anterior com 669 tumores: soma da quantidade de tumores nos olhos (56), cabeça (3), região cervical (103) e nadadeiras anteriores (507). Estes resultados indicaram que 64,8% dos tumores concentravam-se na região anterior, sendo que 75,8% estavam nas nadadeiras, seguidos por 15,4% na região cervical e 8,4% nos olhos, restando apenas 0,4% na cabeça. A soma dos tumores na região posterior, incluindo as nadadeiras (294) e a região inguinal/cauda (12), resultou em 306 tumores. Desta forma, registrou-se que 29,6% dos tumores quantificados estavam na região posterior e deste total 96,1% concentravam-se nas nadadeiras. Também foram encontrados tumores no plastrão (49) e em menor quantidade na carapaça (9). Estes dados corroboram estudos realizados por Baptistotte (2007) que quantificou 4.335 tumores em tartarugas verdes, dos quais 72,5% concentravam-se na região anterior do corpo (50,1% nas nadadeiras anteriores) e 25,2% na região posterior.

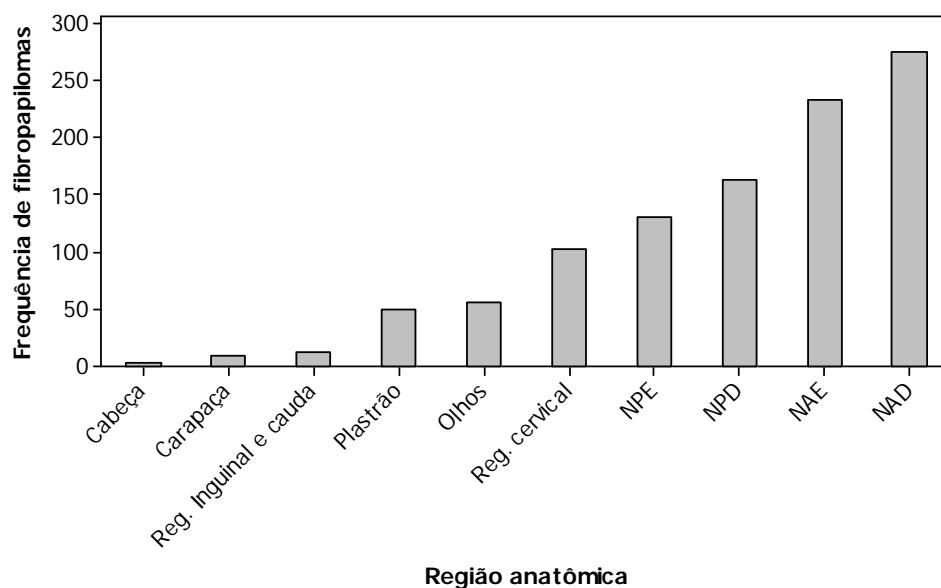


Figura 3.14 – Frequência de fibropapilomas por região anatômica

Nota: Reg. - região; NAD - nadadeira anterior direita; NAE - nadadeira anterior esquerda; NPD - nadadeira posterior direita e NDE - nadadeira posterior esquerda

Apenas 6% das tartarugas apresentaram tumores na cabeça, 8% na região inguinal e cauda e 16% na carapaça, sendo que os fibropapilomas nessas regiões foram classificados somente nos tipos A e B. Uma quantidade maior de animais apresentou tumores no plastrão (34%), na região cervical (56%), nos olhos direito (30%) e esquerdo (38%). A maioria tinha tumores na nadadeira anterior direita (76%) e esquerda (84%) e 58% das tartarugas tinham tumores nas nadadeiras posteriores direita e esquerda.

A quantidade de fibropapilomas por tartaruga variou de 1 a 61 (N=50), sendo que em UBA houve variação entre 1 e 50 tumores (N=35). Estudos anteriores na mesma região revelaram variação entre 2 e 106 fibropapilomas por animal (N=27) (Rossi, 2007). As nadadeiras concentraram a maior parte dos tumores e apenas três animais apresentaram fibropapilomas na cabeça e somente quatro na região inguinal e cauda.

A maioria dos tumores quantificados foi classificada nas categorias de tamanho A (446 tumores) e B (520 tumores) e em menor proporção nas categorias C (62 tumores) e D (apenas 5 tumores). A escassez de tumores maiores (categoria D) e grande quantidade nas categorias A e B também foi reportada por Baptistotte (2007).

As três tartarugas verdes acometidas capturadas em ALM apresentaram tumores classificados apenas nas categorias de tamanho A e B (Figura 3.15). Animais provenientes de VIT (N=12) tinham tumores que foram classificados nas categorias A, B e C (Figura 3.16). Das trinta e cinco tartarugas verdes presentes no CReab-UBA apenas três tiveram

fibropapilomas classificados na categoria D, sendo que dois destes apresentaram tumores nas quatro classes de tamanho (Figura 3.17).

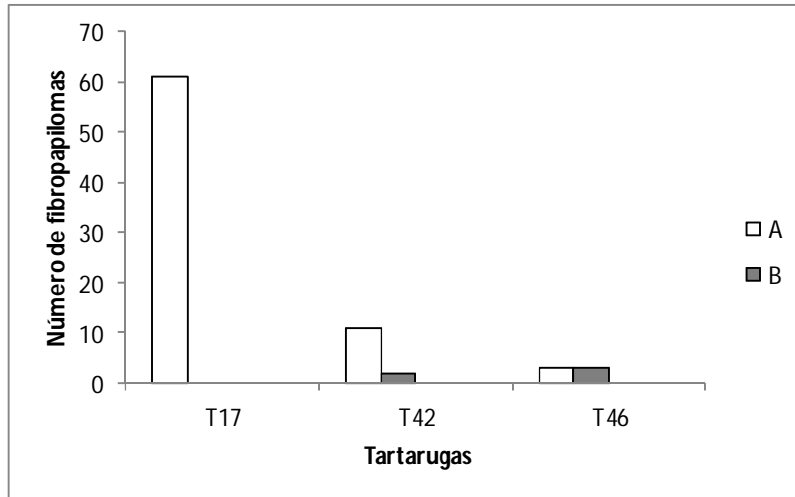


Figura 3.15 – Número de fibropapilomas por categoria de tamanho (A e B) de cada tartaruga capturada em Almofala/CE

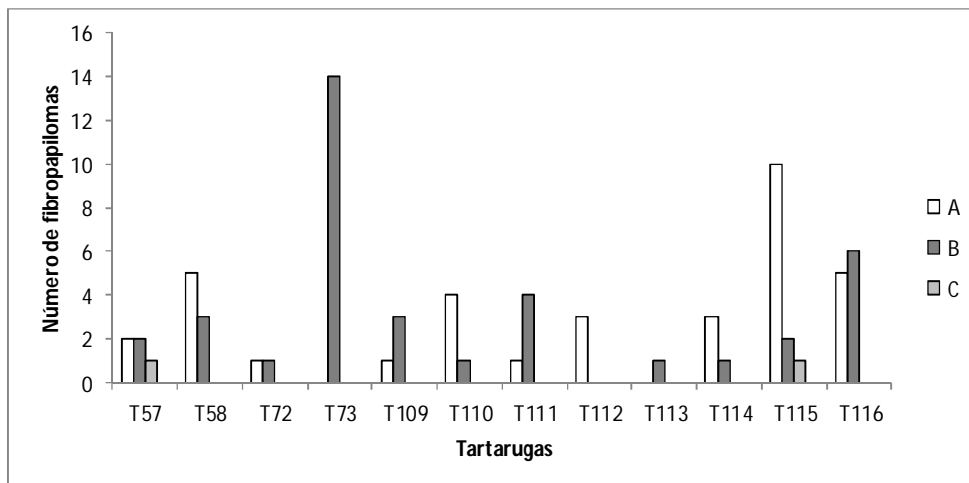


Figura 3.16– Número de fibropapilomas por categoria de tamanho (A, B e C) de cada tartaruga capturada em Vitória/CE

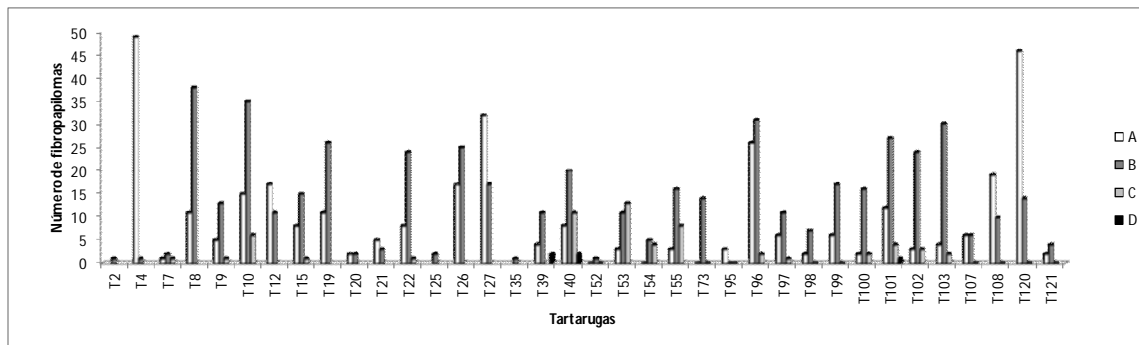


Figura 3.17– Número de fibropapilomas por categoria de tamanho (A, B C e D) de cada tartaruga encaminhada ao Centro de Reabilitação do Projeto Tamar-ICMBio em Ubatuba/SP

Com relação ao índice da fibropapilomatose (FPI) que gera o grau de severidade da doença ou escore da fibropapilomatose (FPS), a maioria das tartarugas verdes amostradas foi classificada em grau “leve” (FPS 1; N=34), catorze como grau “moderado” (FPS 2) e apenas duas classificaram-se como “severo” (FPS 3), sendo ambas provenientes de Ubatuba. Tartarugas não acometidas (N=77) foram classificadas com o algarismo “zero” (FPS 0), indicando a ausência da doença.

A proposta de desenvolvimento de um escore da fibropapilomatose (FPS) se tornou relevante, pois ao aplicarem-se propostas já existentes na literatura verificou-se não adequação à situação das tartarugas verdes acometidas e capturadas no Brasil. Entretanto, esta proposta ainda está em conclusão e validação para possibilitar análises mais concretas considerando o estado de saúde dos animais acometidos ou não. A validação de uma proposta como esta permitirá que seja aplicada em todo o país.

Correlações entre FPS e CCC não revelaram diferenças (N=127; P=0,202) (Figura 3.18). Também não houve diferença nas correlações entre FPS e ICC (N=100; P=0,046) (Figura 3.19).

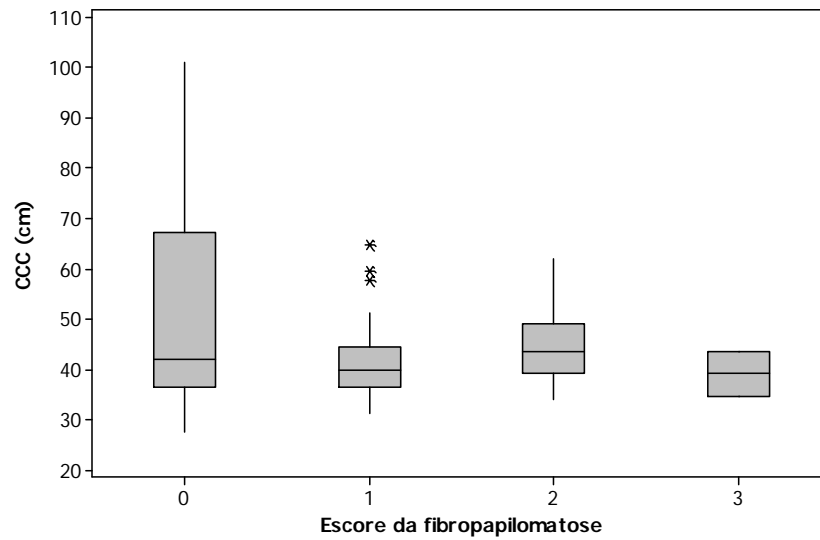


Figura 3.18 – Boxplot do comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) de acordo com o escore da fibropapilomatose

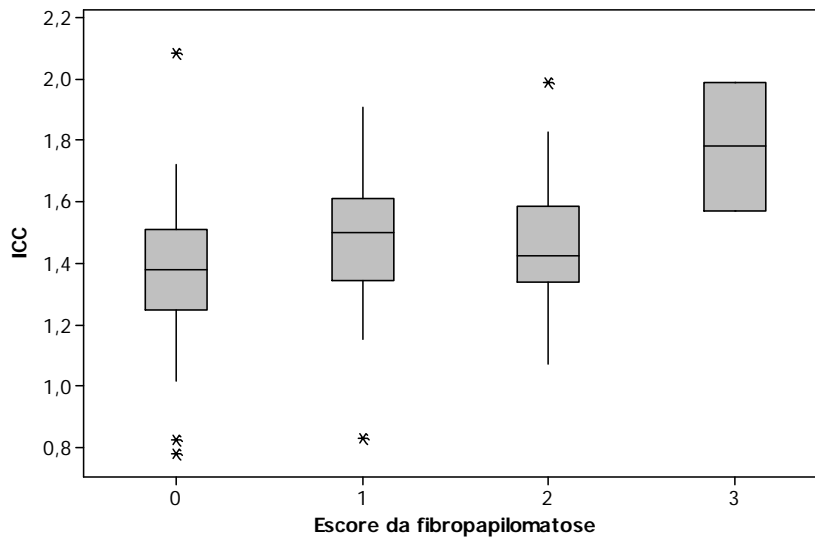


Figura 3.19 – Boxplot do índice de condição corporal (ICC) de acordo com o escore da fibropapilomatose

Como os dados de CCC e ICC, ao serem analisados de acordo com o FPS, não revelaram diferenças, pôde-se pensar que não há uma relação direta entre o tamanho, condição corporal e grau de severidade da doença. O ICC mediano dos animais não acometidos (FPS 0) foi menor que os classificados nos demais escores.

### 3.4 Conclusões

Os dados obtidos corroboraram com os já existentes em literatura no Brasil e por isso podem representar uma tendência populacional regional, especialmente com relação à distribuição dos tumores nas tartarugas. O ICC revelou informações objetivas sobre o estado físico do animal, tornando-se mais relevante que utilizar apenas a massa corporal. A proposta de definição de escores para determinar o grau de severidade da doença pode contribuir para uma melhor compreensão do desenvolvimento da doença, possibilitando correlações com outros dados (hematológicos, imunológicos, genéticos, toxicológicos). Estudos sobre espécies que apresentam frequentes deslocamentos, longas migrações, maturidade sexual tardia e longevidade, como é o caso das tartarugas verdes, devem ser sempre considerados para manterem o fluxo de informações sobre sua história natural. Desta forma, possibilitam avanços no plano de ação para sua conservação.

### Referências

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. (Coord.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa; São Paulo: InterTox, 2004. 322 p.

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

BAPTISTOTTE, C. **Caracterização espacial e temporal da fibropapilomatose em tartarugas marinhas da costa brasileira**. 2007. 63 p. 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.

BUGONI, L.; KRAUSE, L.; PETRY, M.V. Marine debris and human impacts on sea turtles in southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 42, n. 12, p. 1330-1334, 2001.

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.

FAO Fisheries Synopsis, Rome, v. 11, n. 125, p. 81, 1990.

FIGUEROA, A.; ALVARADO, J.; HERNÁNDEZ, F.; RODRÍGUEZ, G.; ROBLES, J. **The ecological recovery of sea turtles of Michoacán, México. Special attention to the black turtle (*Chelonia agassizi*):** final report to WWF-USFWS. Albuquerque: 1993. 96 p.

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.

HIRTH, H.F. **Synopsis of the biological data on green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758).** Washington: U.S. Fish and Wildlife Service, 1997. 126 p.

MARCOVALDI, M.A.A.G.D.; SANTOS, A.S. dos; SALES, G. (Org.). Ameaças às tartarugas marinhas. In: \_\_\_\_\_. **Plano de Ação Nacional para Conservação das Tartarugas Marinhas.** Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011. pt. 1, p. 48-55. (Série Espécies Ameaçadas, 25).

MAST, R.B.; HUTCHINSON, B.J.; HOWGATE E.; PILCHER, N.J. MTSG update: IUCN/SSC marine turtle specialist group hosts the second burning issues assessment workshop. **Marine Turtle Newsletter**, Exeter, v. 110, p. 13–15, 2005

MEYLAN, A.B.; MEYLAN, P.A. Introducción a la evolución, historias de vida y biología de las tortugas marinas. In: ECKERT, K.L.; BJORDNAL, K.A.; ABREU-GROBOIS, F.A.; DONNELLY, M. (Ed.). **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas.** Tradução de R. Breseño-Dueñas e F.A. Abreu-Grobois. Washington: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group, 2000. p. 3-5. (Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación, 4).

ORAVETZ, C.A. Reducción de la captura incidental en pesquerías. In: ECKERT, K.L.; BJORDNAL, K.A.; ABREU-GROBOIS, F.A.; DONNELLY, M. (Ed.). **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas.** Tradução de R. Breseño-Dueñas e F.A. Abreu-Grobois. Washington: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group, 2000. p. 217-221. (Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación, 4).

ROSSI, S. **Estudo do impacto da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758) (Testudines, Cheloniidae).** 2007. 104 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007.

ROSSI, S.; ZWARG, T.; SANCHEZ, T.C.; CESAR, M.O.; WERNECK, M.R.; MATUSHIMA, E.R. Hematological profile of *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) according to the severity of fibropapillomatosis or its absence. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 12, p. 974-978, 2009.

ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G.; BAPTISTOTTE, C.; LIMA, E.H.S.M.; BECKER, J.H.; MATUSHIMA, E.R. Establecimiento de escores para determinar el grado de severidad de la fibropapilomatosis en *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) capturadas en la costa brasileira. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE REABILITAÇÃO DE FAUNA MARINHA, 2., 2012, Rio Grande. **Resumos...** Rio Grande: CRAM-Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG-Aiuká, 2012. p. 161.

ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G.; MATUSHIMA, E.R. A proposal to objectively classify fibropapillomatosis severity in sea turtles considering number and size of tumors. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 33., 2013, Baltimore. **Abstracts...** Miami: U.S. Department of Commerce-NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-645, 2013. p. 27.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; ROSSI, S.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G.; MARIGO, J.; BERTOZZI, C.P.; MATUSHIMA, E.R. Body condition index of *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) with and without fibropapillomatosis along the coast of Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 33., 2013, Baltimore. **Abstracts...** Miami: U.S. Department of Commerce-NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-645, 2013. p. 29.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; ROSSI, S.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G.; BAPTISTOTTE, C.; BECKER, J.H.; LIMA, E.H.S.M.; MATUSHIMA, E.R. Distribución anatómica de fibropapilomas en tortugas verdes, *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae), capturadas en la costa brasileira. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE REABILITAÇÃO DE FAUNA MARINHA, 2., 2012, Rio Grande. **Resumos...** Rio Grande: CRAM-Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG-Aiuká, 2012a. p. 163.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; ROSSI, S.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G.; MARIGO, J.; BERTOZZI, C.P.; BAPTISTOTTE, C.; BECKER, J.H.; MATUSHIMA, E.R. Comparison between corporal subjective classification and body condition index (BCI) for *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) caught in Brazilian coast. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE REABILITAÇÃO DE FAUNA MARINHA, 2., 2012, Rio Grande. **Resumos...** Rio Grande: CRAM-Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG-Aiuká, 2012b. p. 162.

SANTOS, R.G. **Avaliação da população de tartaruga-verde, *Chelonia mydas*, em uma área de alimentação e desenvolvimento degradada no litoral do Espírito Santo, Sudeste Brasileiro.** 2009. 78 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.

SAZIMA, I.; SAZIMA, M. Aspectos de comportamento alimentar e dieta da tartaruga marinha, *Chelonia mydas*, no litoral Norte Paulista. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, São Paulo, v. 32, p. 199–203, 1983.

SEMINOFF, J.A.; JONES, T.T.; RESENDIZ, A.; NICHOLS, W.J.; CHALOUPKA, M.Y. Monitoring green sea turtles (*Chelonia mydas*) at a coastal foraging area in Baja California, Mexico: multiple indices to describe populations status. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Cambridge, v. 83, p. 1355-1362, 2003.



SILVA, J.D. **Ocorrência de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em tartarugas marinhas *Chelonia mydas***. 2009. 69 p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Química e Geológica) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SPOTILA, J.R. **Sea turtles: a complete guide to their biology, behaviour and conservation**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press and Oakwood Arts, 2004. 227 p.

TOREZANI, E.; BAPTISTOTTE, C.; MENDES, S.L.; BARATA, P.C.R. Juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) in the effluent discharge channel of a steel plant, Espírito Santo, Brazil, 2000-2006. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Cambridge, v. 90, n. 2, p. 233-246, 2010.

WITHERINGTON, B.E. Reducción de las amenazas al hábitat de anidación. In: ECKERT, K.L.; BJORDNAL, K.A.; ABREU-GROBOIS, F.A.; DONNELLY, M. (Ed.). **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas**. Tradução de R. Breseño-Dueñas e F.A. Abreu-Grobois. Washington: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group, 2000. p. 204-210. (Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación, 4).

WOOD, F.; WOOD, J. Release and recapture of captive-reared green sea turtles, *Chelonia mydas*, in the waters surrounding Cayman Island. **The Herpetological Journal**, London, v. 3, p. 84-89, 1993.

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, n. 4, p. 804-807, Oct. 1999.

## Anexos

### Anexo A

Localização anatômica	Categorias de tamanho			
	A (< 1 cm)	B (1 cm ≤ FP ≤ 4 cm)	C (4 cm < FP ≤ 10 cm)	D (> 10 cm)
Olho direito				
Olho esquerdo				
Escamas córneas da cabeça				
Região cervical				
Carapaça				
Plastrão				
Nadadeira anterior direita (NAD) e pele adjacente				
Nadadeira anterior esquerda (NAE) e pele adjacente				
Nadadeira posterior direita (NPD) e pele adjacente				
Nadadeira posterior esquerda (NPE) e pele adjacente				
Região inguinal e cauda				

Quadro 1 - Localização anatômica dos fibropapilomas e as categorias de tamanho

## Anexo B

Tabela 1 – Comprimentos curvilíneo e retilíneo da carapaça das tartarugas verdes sem tumor

Tartarugas	Local	CCC (cm)	CRC (cm)	Tartarugas	Local	CCC (cm)	CRC (cm)
T14	UBA	27,5	24,3	T66	VIT	42,1	38,4
T30	UBA	30	26,7	T61	VIT	42,4	38,7
T31	UBA	30	26,7	T88	FN	43,6	39,8
T23	UBA	30,5	27,2	T124	UBA	45,0	41,2
T51	UBA	32,3	28,9	T50	ALM	45,9	42,0
T32	UBA	32,8	29,4	T18	ALM	46,5	42,6
T13	UBA	33	29,6	T71	VIT	47,2	43,3
T125	UBA	33,2	29,8	T76	FLO	47,3	43,4
T62	VIT	33,3	29,9	T44	ALM	47,8	43,9
T34	UBA	34,3	30,9	T47	ALM	49,1	45,1
T60	VIT	34,4	30,9	T79	FN	49,5	45,5
T105	UBA	34,8	31,3	T5	UBA	51,5	47,5
T106	UBA	35	31,5	T87	FN	55	50,8
T65	VIT	35,4	31,9	T90	FN	55	50,8
T37	UBA	35,5	32,0	T84	FN	61,3	56,9
T6	UBA	35,7	32,2	T93	FN	63	58,5
T63	VIT	35,7	32,2	T82	FN	66,7	62,1
T28	UBA	36	32,5	T81	FN	66,8	62,2
T69	VIT	36,2	32,7	T133	FN	67	62,4
T126	UBA	36,5	33,0	T94	UBA	67,6	63,0
T41	ALM	36,5	33,0	T135	FN	69,5	64,8
T59	VIT	37	33,5	T92	FN	70,5	65,8
T70	VIT	37	33,5	T129	FN	71,4	66,7
T68	VIT	37,4	33,8	T131	FN	71,5	66,7
T29	UBA	37,5	33,9	T127	FN	72,5	67,7
T75	FLO	37,5	33,9	T132	FN	72,9	68,1
T43	ALM	37,6	34,0	T83	FN	73,5	68,7
T67	VIT	37,6	34,0	T128	FN	74	69,2
T45	ALM	37,7	34,1	T91	FN	76,5	71,6
T16	ALM	37,9	34,3	T134	FN	77,1	72,2
T24	UBA	38,5	34,9	T86	FN	78,1	73,1
T1	UBA	39	35,4	T89	FN	79,5	74,5
T56	UBA	39	35,4	T78	FN	80	75,0
T33	UBA	39,5	35,9	T80	FN	80,5	75,4
T11	UBA	39,8	36,2	T38	UBA	81,3	76,2
T49	ALM	39,9	36,3	T85	FN	82,5	77,4
T74	FLO	41,1	37,4	T130	FN	83,3	78,1
T64	VIT	41,8	38,1	T77	FN	101	95,2
T104	UBA	41,9	38,2				
Média e desvio padrão (CCC)		50,2 ± 17,9		Média e desvio padrão (CRC)		46,2 ± 17,3	

Nota: FLO=Florianópolis, UBA=Ubatuba, VIT=Vitória, ALM=Almofala e FN=Fernando de Noronha  
 CCC: Comprimento curvilíneo da carapaça; CRC: Comprimento retilíneo da carapaça

Tabela 2 – Comprimentos curvilíneo e retilíneo da carapaça das tartarugas verdes com tumor

Tartarugas	Local	CCC (cm)	CRC (cm)	Tartarugas	Local	CCC (cm)	CRC (cm)
T112	VIT	31	27,7	T7	UBA	40,3	36,6
T52	UBA	31,5	28,2	T109	VIT	40,7	37,0
T108	UBA	33,3	29,9	T21	UBA	41	37,3
T116	VIT	33,8	30,4	T107	UBA	41	37,3
T22	UBA	34	30,6	T122	UBA	41	37,3
T54	UBA	34	30,6	T17	ALM	41,2	37,5
T20	UBA	34,2	30,8	T113	VIT	41,6	37,9
T99	UBA	34,4	30,9	T2	UBA	42,1	38,4
T40	UBA	34,5	31,0	T4	UBA	43	39,2
T53	UBA	34,5	31,0	T19	UBA	43	39,2
T97	UBA	35,5	32,0	T10	UBA	43,6	39,8
T118	UBA	35,8	32,3	T8	UBA	44	40,2
T9	UBA	36,5	33,0	T26	UBA	44	40,2
T15	UBA	36,5	33,0	T42	ALM	44	40,2
T121	UBA	36,6	33,1	T58	VIT	45,3	41,5
T25	UBA	37	33,5	T110	VIT	45,9	42,0
T98	UBA	37	33,5	T55	UBA	46	42,1
T100	UBA	37	33,5	T115	VIT	47,5	43,6
T119	UBA	37,0	33,5	T102	UBA	47,7	43,8
T120	UBA	37,0	33,5	T3	UBA	49	45,0
T72	VIT	37,3	33,7	T35	UBA	49,5	45,5
T123	UBA	37,5	33,9	T111	VIT	51	47,0
T103	UBA	38,3	34,7	T39	UBA	57,5	53,2
T12	UBA	38,5	34,9	T96	UBA	57,8	53,5
T57	VIT	38,6	35,0	T36	UBA	59	54,7
T101	UBA	39,5	35,9	T95	UBA	59,5	55,2
T73	VIT	39,7	36,1	T27	UBA	62	57,6
T114	VIT	39,9	36,3	T46	ALM	64,7	60,2
Média e desvio padrão (CCC)		41,8 ± 7,9		Média e desvio padrão (CRC)		38,1 ± 7,6	

Nota: UBA=Ubatuba, VIT=Vitória e ALM=Almofala

CCC: Comprimento curvilíneo da carapaça; CRC: Comprimento retilíneo da carapaça

#### 4 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA ATIVIDADE DE LEUCÓCITOS DE *Chelonia mydas* (TESTUDINES, CHELONIIDAE) (LINNAEUS 1758) COM E SEM FIBROPAPILOMATOSE

##### Resumo

*Chelonia mydas* é uma espécie de tartaruga marinha que se alimenta em diversas áreas da costa brasileira, nas quais encontra uma variedade de plantas aquáticas e algas que são a base da sua dieta alimentar. A espécie tem sido acometida pela fibropapilomatose (FP), doença cuja causa é considerada multifatorial (*Chelonid Fibropapilloma-associated Herpesvirus*, fatores ambientais e genéticos). Desta forma, a análise da atividade dos leucócitos torna-se importante para uma melhor compreensão da imunossupressão ocasionada pela FP. Foram analisadas 49 amostras sanguíneas (33 de tartarugas com FP) colhidas de espécimes capturados na região de Ubatuba/SP. Os parâmetros hematológicos foram analisados como apoio aos resultados da atividade celular. Foram obtidos dados biométricos das tartarugas: comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), massa corporal (MC) e índice de condição corporal (ICC); tamanho (classificação em categorias A, B, C e D), quantidade e localização anatômica dos tumores, os quais foram utilizados para o desenvolvimento de escores da FP (FPS). Os objetivos do trabalho foram (1) avaliar a atividade dos leucócitos por citometria de fluxo, através da análise da fagocitose induzida por Zymosan A e do *burst* oxidativo induzido por miristato-acetato de forbol (PMA); (2) estabelecer correlações entre a atividade celular e os dados biométricos; (3) estabelecer correlações entre a atividade celular e FPS propostos (leve, moderado e severo). Os resultados dos linfócitos (Lin), monócitos (Mon) e granulócitos (Gran) indicou que houve diferença entre os grupos controle e estimulado somente na análise da fagocitose (resultados da análise da média de intensidade de fluorescência-MIF). Não houve diferenças entre animais com e sem FP nas análises da citometria de fluxo, dos parâmetros hematológicos e de acordo com o FPS. No entanto, os números medianos de Mon e Lin foram maiores nas tartarugas classificadas no escore leve, dos heterófilos (Het) foi maior nos animais contidos no escore severo e a proporção mediana Het/Lin foi maior nas tartarugas não acometidas. Já na avaliação do *burst* oxidativo, observou-se que os Lym dos espécimes classificadas no escore “leve” tiveram MIF mediana maior que os demais (moderado e severo) e os Mon das tartarugas verdes classificadas no escore “moderado” apresentaram MIF mediana maior em comparação com os outros grupos (leve e severo). Estes resultados podem fornecer informações sobre o *status* de saúde das tartarugas verdes e como os leucócitos podem reagir diante da FP. A citometria de fluxo é uma ferramenta que pode trazer conhecimento e habilidades contribuindo para questões relacionadas à Biologia e Medicina da Conservação.

Palavras-chave: Tartaruga verde; Fibropapiloma; Leucócitos; Fagocitose; *Burst* oxidativo

##### Abstract

*Chelonia mydas* is a marine turtle that feeds in many areas of Brazilian coast where finds a variety of algae and aquatic plants, which are the base of its diet. This species has been affected by fibropapillomatosis (FP), disease whose cause is considered multifactorial (the *Chelonid Fibropapilloma-associated Herpesvirus*, environmental and genetic factors). Thus, the analysis of leucocytes activity becomes important for a better understanding about immunosuppression caused by FP. Were analyzed 49 blood samples (33 of affected turtles)

took from specimens caught in the Ubatuba/SP region. The hematological parameters were analyzed as a support for the results about leucocytes activity. Biometric data were obtained: curved carapace length (CCL), body mass (BM) and body condition index (BCI); size (according categories A, B, C and D), numbers and anatomical distribution of tumors, which was used to develop a new proposal for FP scores (FPS). The aims were (1) to assess leucocytes activity by flow cytometry, through analyzes of phagocytosis stimulated by Zymosan A and oxidative burst stimulated by phorbol miristate-acetate (PMA); (2) to establish correlations between leucocytes activity and biometric data; (3) to establish correlation between leucocytes activity and FPS proposed (mild, moderate and severe). The results of lymphocytes (Lym), monocytes (Mon) and granulocytes (Gran) demonstrated difference between the control and stimulated groups only for phagocytosis analysis (results of mean fluorescence intensity -MFI). There were not differences between animals with and without FP in flow cytometry and hematological analyzes and according FPS. However, the median number of Mon and Lym were higher in green sea turtles classified as “mild”, heterophils (Het) were higher in animals included as “severe” and the ratio Het/Lym revealed higher values in non-affected turtles. About oxidative burst assessment, were observed that Lym of specimens classified as “mild” had median MFI higher than others (moderate and severe) and Mon of green sea turtles classified as “moderate” presented median MFI higher comparing with other groups (mild and severe). These results can provide information about health status of green sea turtles and how the leucocytes can react against FP. The flow cytometry is a tool that can bring knowledge skills and contribute for Biology and Medicine Conservation.

Keywords: Green sea turtle; Fibropapilloma; Leucocytes; Phagocytosis; Oxidative burst

#### 4.1 Introdução

A tartaruga verde (*Chelonia mydas*) apresenta distribuição circunglobal, sendo a espécie de tartaruga marinha que apresenta hábitos mais costeiros (HIRTH, 1997). Migram através das áreas de alimentação e nidificação, porém passam a maior parte de suas vidas em pequenas áreas alimentando-se de algas e plantas aquáticas (SPOTILA, 2004).

A doença denominada fibropapilomatose é uma importante ameaça à tartaruga verde (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011) sendo considerada debilitante e fatal (AGUIRRE et al., 1998). É caracterizada por tumores cutâneos chamados fibropapilomas, que podem interferir no deslocamento dos animais acometidos e comprometer sua alimentação (ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997). Os fibropapilomas podem se desenvolver em diversas partes do corpo do animal e possuem diferentes colorações e tamanho (BAPTISTOTTE, 2007; ROSSI, 2007), sendo que as maiores formações podem estar ulceradas e necróticas (JACOBSON et al., 1989).

Estudos sobre sequências gênicas obtidas de fibropapilomas indicaram o alfa herpesvírus denominado C-FP-HV (*Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus*) como agente etiológico (LACKOVICH et al., 1999; ENE et al., 2005; WORK et al., 2009).

No entanto, há um consenso de que a etiologia seja multifatorial (JACOBSON et al., 1991; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997; AGUIRRE et al., 1998).

A imunidade natural confere a primeira linha de defesa através da atividade fagocítica e resposta inflamatória e a imunidade adquirida envolve os linfócitos B, cujas respostas são desencadeadas quando há substâncias estranhas no organismo (AZEVEDO; CHASIN, 2004). Em vertebrados ectotérmicos, o sistema imune inato é um componente crucial para a proteção contra infecções microbianas, sendo a fagocitose um importante constituinte (KUMAR, 2011) e uma importante ferramenta de defesa celular (KWIATKOWSKA; SOBOTA 1999 *apud* ZIMMERMAN et al., 2010).

Organismos aeróbios têm um sistema de defesa antioxidante responsável por prevenir, neutralizar ou reparar danos induzidos pelas espécies reativas de oxigênio ou EROs (VALVIDIA et al., 2007) que são importantes na resposta imunológica (LESSER, 2006 *apud* LABRADA-MARTAGÓN et al., 2011).

Os macrófagos produzem EROs como produto de secreção de fagócitos ativados, resultado de uma sequência de reações bioquímicas de alto consumo de oxigênio conhecidas como *burst* oxidativo (SILVA, 2003) e os heterófilos também são reconhecidos por exercerem atividade fagocítica e produzirem EROs (CAMPBELL, 2006).

Considerando a necessidade de se avaliar a atividade celular em tartarugas verdes acometidas ou não pela fibropapilomatose, foram dedicados esforços no desenvolvimento de uma metodologia para obtenção dos leucócitos, aplicação dos estímulos, aquisição e análise utilizando o citômetro de fluxo.

A citometria de fluxo foi utilizada, pois possibilita a utilização de pequeno volume sanguíneo e permite múltiplas possibilidades experimentais (AFFONSO, 2006), discriminando populações celulares com velocidade e avaliando os resultados quantitativamente (SILVA, 2003). Além disso, é um instrumento de monitoramento ambiental que auxilia no delineamento de estratégias visando à conservação de quelônios de vida livre (GENOY-PUERTO, 2008) e possibilita a aplicação dos estímulos *in vitro* para avaliação da atividade celular.

## 4.2 Desenvolvimento

### 4.2.1 Obtenção das amostras sanguíneas

Os espécimes de *Chelonia mydas* foram capturados incidentalmente ou resgatados de diversas formas, de acordo com o monitoramento realizado pelas equipes do Projeto Tamar-ICMBio.

As capturas ocorreram em praias das cidades de Ubatuba/SP, São Sebastião/SP e Angra dos Reis/RJ e as tartarugas foram encaminhadas ao Centro de Reabilitação do Projeto Tamar-ICMBio da base de Ubatuba/SP (CREab-UBA).

Sendo assim, visando melhor organização dos dados, todas as tartarugas foram agrupadas em apenas uma cidade: Ubatuba (UBA) (Figura 4.1). Além disso, considerou-se o local onde foram mantidas até o momento da soltura: CREab-UBA.

Para a obtenção das amostras sanguíneas foi necessária apenas contenção física das tartarugas.

A punção venosa foi realizada no seio venoso cervical, tendo o osso occipital como referência para sua localização (OWENS; RUIZ, 1980; SAMOUR et al., 1984; PAGE; MAUTINO, 1990; GOTTDENKER; JACOBSON, 1995).

O local da punção foi devidamente desinfetado com álcool iodado e o volume de sangue colhido, com agulha 30x7 mm, variou entre 2 mL e 3 mL (Figura 4.2). Segundo Mader (1996), em geral os répteis suportam a colheita de um volume sanguíneo correspondente a 10% do volume total de sangue de seu corpo.



Figura 4.1 – Localização de Ubatuba no litoral do Estado de São Paulo: cidade onde se encontra a base do Projeto TAMAR-ICMBio (local de obtenção das amostras sanguíneas). Fonte: www.google.com



Figura 4.2 – Colheita de amostra sanguínea. Foto: Angélica M. Sánchez-Sarmiento

Amostras de sangue também foram obtidas de *Chelonia mydas* que estavam na área de quarentena do Aquário Municipal de Santos/SP (24°05'16.00''S 046°17'43.00''W) e encaminhadas para os testes iniciais de *Sorting* na citometria de fluxo.

O sangue obtido foi acondicionado em tubos devidamente identificados contendo heparina sódica (Vacutainer<sup>®</sup>, Beckton-Dickinson, EUA), pois o EDTA causa hemólise em amostras sanguíneas de quelônios (McARTHUR; WILKINSON; MEYER, 2004) por quelar o cálcio e outros metais. Uma alíquota foi separada logo após a colheita, sem anticoagulante, para confecção de extensões sanguíneas (utilizadas para a contagem diferencial de leucócitos). O tempo entre coleta e processamento do hemograma não ultrapassou 24 horas.

Após a obtenção do sangue, 1 mL de cada amostra foi acondicionado em tubos contendo 1 mL de RPMI1640 (Gibco<sup>®</sup>, LifeTechnologies<sup>™</sup>, EUA) para a manutenção da viabilidade celular e posterior avaliação da atividade celular por citometria de fluxo.

O transporte foi feito sob refrigeração até os laboratórios do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) para o processamento das amostras. A análise da atividade celular foi realizada no laboratório de Farmacologia e Toxicologia, e o hemograma no laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens.



#### 4.2.2 Preparação das amostras para análise da atividade celular

##### 4.2.2.1 Obtenção de leucócitos usando Percoll™

O Percoll™ (GE-Healthcare Bio-Sciences, Suécia) utilizado para a separação dos leucócitos foi preparado de acordo com Muñoz et al. (2009): 57% solução estoque de Percoll (9:1; Percoll:Hanks 10x) e 43% solução de Hanks 1x (Gibco®, LifeTechnologies™, EUA).

A mistura sangue e RPMI1640 foi adicionada a 2 mL de Percoll 57% e em seguida centrifugada por 5 minutos, 1280 g e 18°C. Os leucócitos foram removidos e transferidos a tubos contendo 10 mL de PBS 1x (*phosphate-buffered saline*). Nova centrifugação foi realizada por 10 minutos, 300 g e 18°C com o objetivo de eliminar os resíduos de Percoll. Ao *pellet* resultante foi adicionado 1 mL de PBS e realizada a contagem dos leucócitos viáveis utilizando Azul de Tripán (Sigma®) 1:9 (10 µL da amostra - 90 µL de Azul de Tripán). Para a realização dos estímulos é necessário que haja no mínimo 95% de viabilidade celular.

##### 4.2.2.2 Preparação das amostras para avaliação da fagocitose e *burst* oxidativo

As amostras, cujos leucócitos estavam viáveis, foram ajustadas a uma concentração de  $4 \times 10^5$  células/mL. Em seguida, foi organizada uma sequência de tubos para aquisição no citômetro:

- Tubo “A”: suspensão de leucócitos em PBS - **Controle**.
- Tubo “B”: suspensão de leucócitos + Zymosan A (*Saccharomyces cerevisiae* Bio Particles®, Alexa Fluor® 594 conjugate) para **avaliação da fagocitose**.
- Tubo “C”: suspensão de leucócitos + DCFH-DA para **avaliação do metabolismo basal**.
- Tubo “D”: suspensão de leucócitos + DCFH-DA + PMA (miristato-acetato de forbol) - Estímulo químico para **avaliação do *burst* oxidativo**.

A incubação das amostras foi realizada em temperatura ambiente por 50 minutos.

A interrupção dos estímulos foi feita com a adição de 2 mL de EDTA 3 mM gelado seguida de centrifugação por 8 minutos, 300 g, 18°C. Ao *pellet* resultante foram adicionados 500 µL de PBS 1x.

A aquisição no citômetro ocorreu mediante os seguintes valores de calibração: 315 (SSC), 489 (FL1) e 566 (FL2) e *Threshold* ajustado para 617 (FSC), 52 (SSC, FL1 e FL2).

A aquisição e análise foi realizada em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems®, San José, CA, U.S.), acoplado a um computador Macintosh (G4) da Apple®. Os dados coletados foram analisados pelo software *CellQuest Pro* (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e *FlowJo* (TreeStar).

#### 4.2.3 Análise de parâmetros hematológicos

Os resultados de parâmetros hematológicos foram utilizados para acrescentar informações às análises da atividade celular, especialmente com relação à contagem total e diferencial de leucócitos.

##### 4.2.3.1 Contagem total de hemácias (He) e de leucócitos (Leu)

Foi utilizado diluente isotônico Natt e Herrick (1952) e contagem em câmara de Neubauer.

O cálculo utilizado para obtenção do número de hemácias e de leucócitos por milímetro cúbico foi realizado de acordo com as fórmulas (1) e (2) respectivamente, considerando que 200 refere-se à diluição, 10 à altura da câmara e 5 ou ¼ à área contada.

$$\text{n}^\circ \text{ de hemácias contadas} \times 200 \times 10 \times 5 \quad (1)$$

$$\text{n}^\circ \text{ de leucócitos} \times 200 \times 10 \times \frac{1}{4} \quad (2)$$

##### 4.2.3.2 Contagem diferencial de leucócitos

A coloração utilizada foi May-Grünwald-Giemsa Merck®, técnica de Rosenfeld (1947).

A leitura foi realizada em microscópio óptico na objetiva com aumento de 100x. Por meio dessa contagem, foram avaliadas e quantificadas as seguintes células: heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos.

#### **4.2.3.3 Determinação do volume globular**

O volume globular consiste no volume de hemácias da amostra sanguínea, estando relacionado ao tamanho e número dos glóbulos vermelhos.

As amostras foram colocadas em tubos capilares e submetidas à centrifugação por 5 minutos em 10.000 rpm. A determinação foi realizada através da leitura em cartão de hematócrito.

#### **4.2.3.4 Proteína plasmática total (Prot PI)**

Após a determinação do volume globular, o plasma contido no tubo capilar foi levado ao refratômetro para a determinação da proteína plasmática total.

#### **4.2.3.5 Dosagem de hemoglobina (Hb)**

A concentração de hemoglobina sanguínea foi realizada pelo método da cianometahemoglobina.

Para realizar a determinação deste parâmetro foi utilizado um kit comercial da empresa LABTEST Reagentes e leitura em analisador LABQUEST (LABTEST Diagnóstica Ltda). O analisador foi ajustado a 100% de transmissão em 540 nm.

#### **4.2.3.6 Volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média**

Esses valores foram obtidos de acordo com os cálculos:

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

#### **4.2.4 Proposta de utilização de escores para definir o grau de severidade da doença**

O número de fibropapilomas em cada categoria de tamanho foi usado para calcular o índice de fibropapilomatose (FPI), aplicando um modelo estatístico utilizando essas categorias

e uma pontuação para cada uma delas que originou a equação (3), na qual  $FP_x$  é o número de tumores em cada categoria de tamanho (ROSSI et al., 2012a e 2013a).

$$FPI = (1 \times FP_A) + (2 \times FP_B) + (4 \times FP_C) + (8 \times FP_D) \quad (3)$$

Esse resultado permitiu classificar o grau de severidade da doença ou escore da fibropapilomatose (FPS – *fibropapillomatosis score*) em três grupos: (1) “leve” ( $FPI < 50$ ), (2) “moderado” ( $50 \leq FPI < 100$ ) e (3) “severo” ( $FPI \geq 100$ ) (ROSSI et al., 2013a).

#### 4.2.5 Análises estatísticas

Utilizou-se o teste de normalidade D’Agostino & Pearson para as amostras avaliadas pela citometria de fluxo. Os dados obtidos na avaliação da atividade celular foram divididos em três análises: (1) Atividade celular (fagocitose e *burst* oxidativo), cujas amostras foram analisadas pelo teste Kruskal-Wallis e Dunn’s *post-test*; (2) Análise do delta (para fagocitose e *burst* oxidativo), cujos dados foram tratados pelo teste Mann-Whitney e (3) Correlações com os dados biométricos, com testes de Spearman e de Pearson.

Para os parâmetros hematológicos, aplicou-se o teste de normalidade Anderson-Darling. Para os dados que apresentaram distribuição normal foi aplicado o teste *2-Sample-t* e para os demais (sem distribuição normal) utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney.

### 4.3 Resultados e Discussão

#### 4.3.1 Atividade celular

Mesmo considerando que a resposta imunológica de répteis é muito influenciada pelo ambiente, podendo ser suprimida ou mesmo inibida por baixas temperaturas (CAMPBELL, 2006), os dados obtidos no presente estudo não foram analisados de acordo com estações do ano e temperatura da água nos tanques de reabilitação.

Das 55 amostras sanguíneas obtidas e encaminhadas à citometria de fluxo (35 com FP e 20 sem FP), quarenta e nove apresentaram resultados satisfatórios com relação à viabilidade celular e aplicação dos estímulos (33 de tartarugas com FP). Sendo necessários 95% de viabilidade celular, em alguns experimentos não foi possível analisar a fagocitose e o *burst*

oxidativo das mesmas amostras devido ao número de leucócitos insuficiente para a concentração de  $4 \times 10^5$  células/mL.

#### 4.3.1.1 Intensidade de fluorescência

O citômetro de fluxo separa as células de acordo com o tamanho (FSC – Forward Scatter) e a granulosidade ou complexidade interna (SSC - Side Scatter).

A figura 4.3 apresenta as populações celulares obtidas com a utilização do Percoll™: R1 (Linfócitos-Lin), R2 (Monócitos-Mon) e R3 (Granulócitos-Gran), cuja amostra não recebeu estímulo (controle).

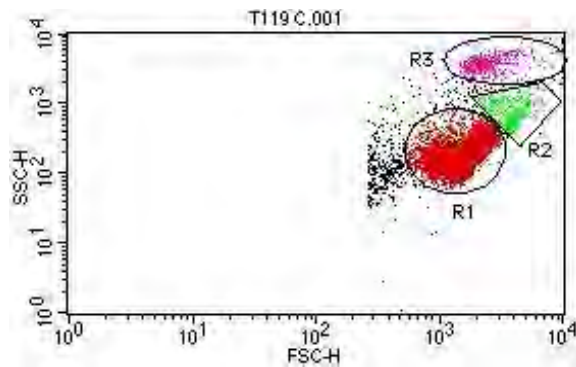


Figura 4.3 - Populações celulares: R1 (Lin), R2 (Mon) e R3 (Gran). Amostra controle (T119 C.001)

Inúmeras tentativas de confirmação das populações celulares foram realizadas no citômetro BD FACSAria™ com amostras de tartarugas verdes mantidas no centro de visitação do Projeto Tamar-ICMBio de Ubatuba/SP e no Aquário de Santos. O melhor resultado permitiu a confirmação de R1 (88,33% de linfócitos, 10% de heterófilos e 1% de monócitos). Entretanto, não foi conclusivo para R2 e R3 embora tenham sido observados monócitos e granulócitos nas lâminas obtidas após o *sorting* (Figura 4.4 A, B e C). Estudos anteriores foram efetuados com o mesmo objetivo, porém foram conclusivos apenas para linfócitos (ROSSI, 2007).

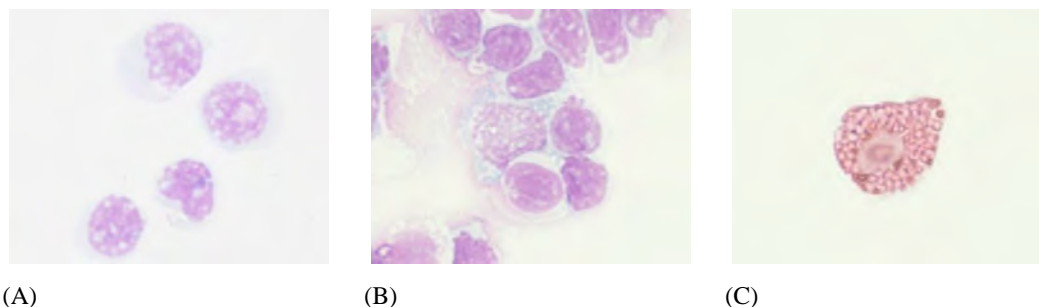


Figura 4.4 – Populações celulares confirmadas pelo Sorting: (A): Linfócitos, (B): Monócito (seta) e (C): Heterófilo. Coloração May-Grünwald-Giemsa, técnica de Rosenfeld (1947). Aumento 1000x. Foto: Silmara Rossi

Nas análises sobre a fagocitose, constatou-se que não houve diferença entre a média de intensidade de fluorescência (MIF) das tartarugas com e sem tumores na análise das populações celulares. No entanto, houve diferença entre os grupos “controle” e “estimulado” no caso das três populações analisadas.

Atividade fagocítica de linfócitos B em répteis já foram reportadas por Zimmerman et al. (2010), fato não observado neste tipo celular de mamíferos. Os linfócitos das tartarugas verdes amostradas apresentaram notável resposta ao estímulo aplicado (Figura 4.5). Entretanto, não foram utilizados marcadores celulares para determinar os tipos de linfócitos que apresentaram a resposta.

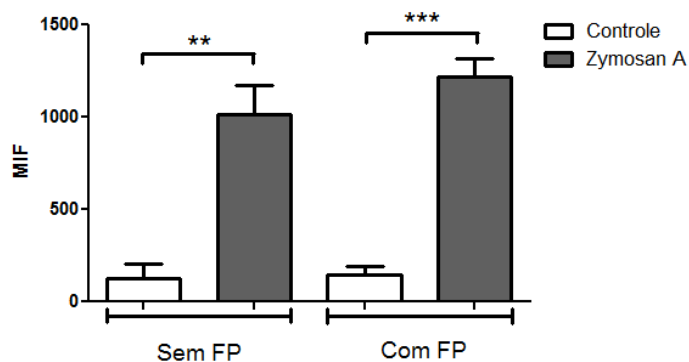


Figura 4.5 - Média de intensidade de fluorescência (MIF) da fagocitose realizada pelos linfócitos (R1). Sem FP: N=11; Com FP: N=22; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001

De acordo com Cuesta e colaboradores (1999), a citotoxicidade é o principal mecanismo de defesa dos vertebrados contra infecções virais e tumores, sendo mediada por *natural killer* (NK) em mamíferos ou células citotóxicas não específicas (NCC) em peixes teleósteos.

Pôde-se perceber que os monócitos responderam ao estímulo aplicado assim como foi registrado em estudos anteriores com amostras de *C. mydas* (ROSSI, 2007; ROSSI et al., 2009) e de *Centropomus parallelus* (robalo) (AFFONSO, 2006). Análises anteriores de Rossi et al. (2012b, 2013b) também não verificaram diferença na atividade destas células ao comparar *C. mydas* com e sem FP (Figura 4.6).

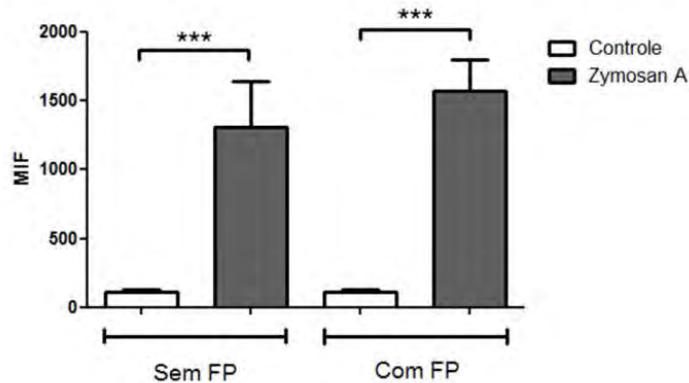


Figura 4.6 - Média de intensidade de fluorescência (MIF) da fagocitose realizada pelos monócitos (R2). Sem FP: N=11; Com FP: N=23; \*\*\* P < 0,001

Os heterófilos foram as células encontradas em maior número nas extensões sanguíneas e nas lâminas preparadas após a obtenção dos leucócitos com o Percoll™. Assim como ocorreu na análise de linfócitos e monócitos, foi registrada diferença entre os grupos “controle” e “estimulado” (Figura 4.7).

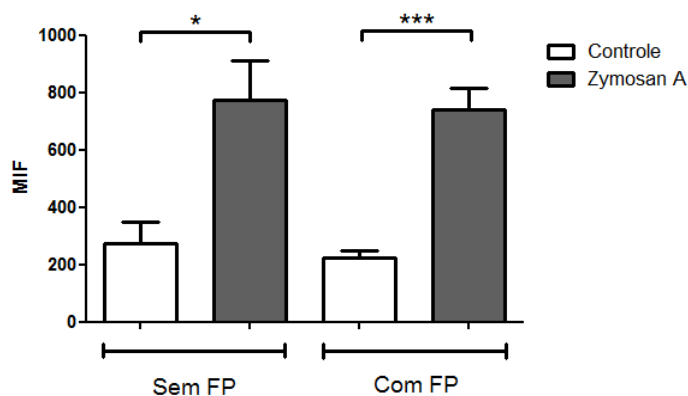


Figura 4.7 - Média de intensidade de fluorescência (MIF) da fagocitose realizada pelos granulócitos (R3). Sem FP: N=9; Com FP: N=20; \* P < 0,05; \*\*\* P < 0,001

Estudos envolvendo tentativas para designar a função bactericida e fagocítica dos heterófilos, provaram que estas células de *Pelodiscus sinensis* podem matar mais do que 60% das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em 180 minutos (PAN; ZOU, 2000 apud ZHANG; GU; LI, 2011). Considerando que sua principal função é a fagocitose e o aumento significativo no número destas células em répteis costuma estar associado à doença inflamatória ou lesão tecidual, além de estresse (excesso de glicocorticoides), neoplasia e leucemia heterofílica (CAMPBELL, 2006), os resultados deste estudo confirmaram a principal atividade celular deste tipo de leucócito.

Com relação à avaliação do *burst* oxidativo, também constatou-se que não houve diferença entre a MIF das tartarugas com e sem tumores na análise das populações celulares: linfócitos (P=0,1282), monócitos (P=0,0230) e granulócitos (P=0,2847).

Embora o PMA seja considerado um bom indicador do metabolismo celular e atividade bactericida (STOSIK et al., 2002), não foi encontrada diferença entre o grupo controle e o grupo estimulado por este composto, tanto para animais sem tumores quanto para tartarugas acometidas de acordo com as análises de linfócitos, monócitos e granulócitos (Figuras 4.8, 4.9 e 4.10 respectivamente).



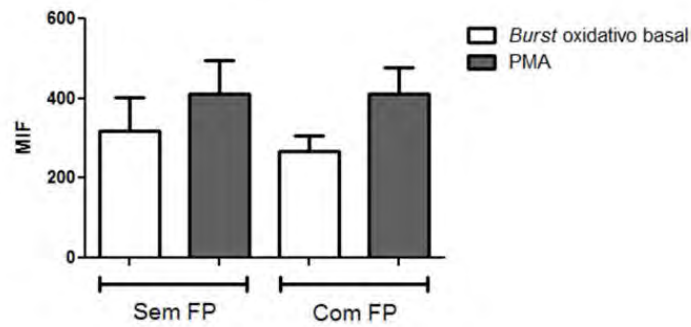


Figura 4.8 - Média de intensidade de fluorescência (MIF) do *burst* oxidativo realizado pelos linfócitos (R1). Sem FP: N=6; Com FP: N=16

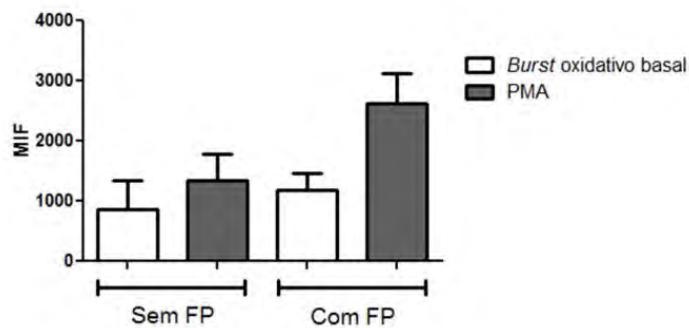


Figura 4.9 - Média de intensidade de fluorescência (MIF) do *burst* oxidativo realizado pelos monócitos (R2). Sem FP: N=5; Com FP: N=13

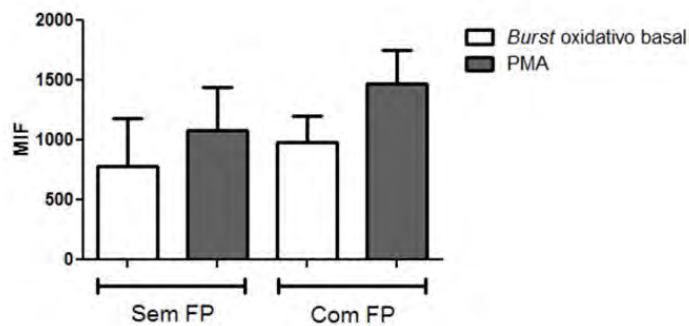


Figura 4.10 - Média de intensidade de fluorescência (MIF) do *burst* oxidativo realizado pelos granulócitos (R3). Sem FP: N=4; Com FP: N=16

Affonso (2006) ao estudar a atividade do PMA para mensurar o *burst* oxidativo de monócitos e trombócitos em amostras sanguíneas de robalos encontrou resultados similares, detectando um aumento da atividade fagocítica e a diminuição da capacidade de destruição de um possível agente invasor por meio da produção de EROs.

O fato de não ter sido registrada diferença entre os grupos controle e estimulado sugere algumas reflexões: (1) o PMA pode não ser de fato o composto indicado para estimular os leucócitos de tartarugas verdes ou (2) o PMA utilizado pode ter sofrido uma possível degradação química antes dos experimentos.

#### 4.3.1.2 Deltas da fagocitose e do *burst* oxidativo

O delta da atividade celular foi o resultado obtido pela subtração entre as MIFs do estímulo e do controle. Este cálculo gerou um valor para cada amostra analisada, considerando as três populações celulares avaliadas.

Apesar de não haver diferença entre animais com e sem tumores na avaliação da fagocitose e do *burst* oxidativo (Tabela 4.1), os deltas da MIF dos linfócitos, monócitos e granulócitos de animais acometidos foram maiores do que os das tartarugas sem tumores (Figuras 4.11 A e B, 4.12 A e B e 4.13 A e B).

Tabela 4.1 – Valores de P para cada população celular analisada na fagocitose e no *burst* oxidativo na comparação entre tartarugas com e sem tumores

Atividade celular	Populações celulares	Valores de P
Fagocitose	Linfócitos	0,3564
	Monócitos	0,2936
	Granulócitos	0,7679
<i>Burst</i> oxidativo	Linfócitos	0,8611
	Monócitos	0,0938
	Granulócitos	0,5391

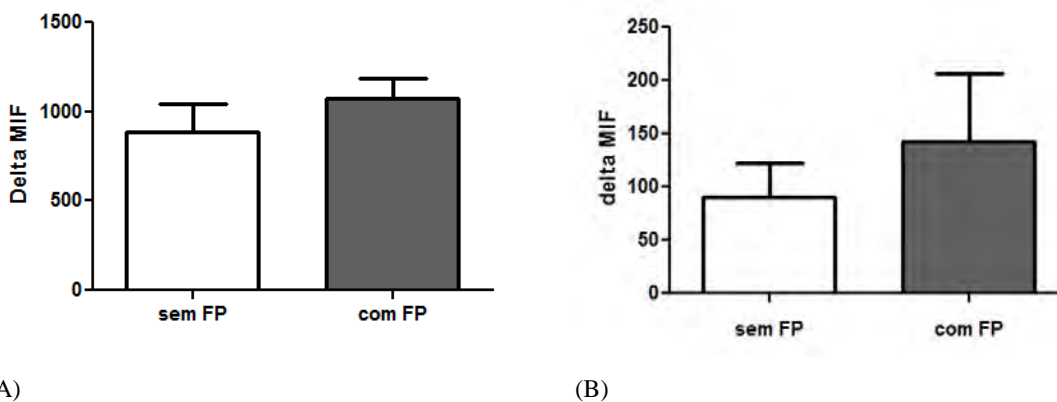
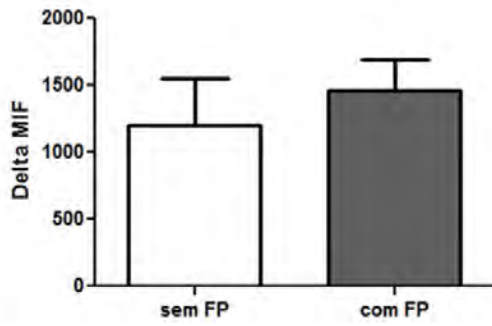
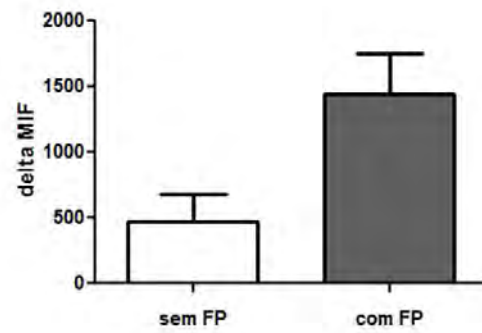


Figura 4.11 – Delta da intensidade fluorescência (MIF) dos linfócitos. (A) Fagocitose e (B) *Burst* oxidativo

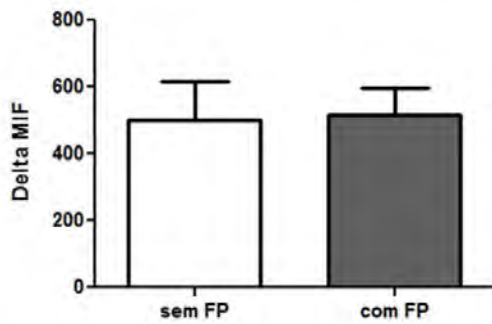


(A)

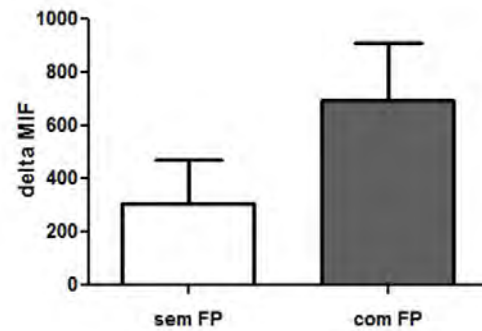


(B)

Figura 4.12 – Delta da intensidade fluorescência (MIF) dos monócitos. (A) Fagocitose e (B) *Burst* oxidativo



(A)



(B)

Figura 4.13 – Delta da intensidade fluorescência (MIF) dos granulócitos. (A) Fagocitose e (B) *Burst* oxidativo

A análise entre deltas MIF de R1, R2 e R3 de tartarugas não acometidas não indicou diferenças entre estas populações celulares (Figura 4.14). Entretanto, na avaliação das amostras de animais com FP houve diferenças entre linfócitos e monócitos e entre linfócitos e granulócitos na análise do *burst* oxidativo e entre R1 e R3 e entre R2 e R3 na avaliação da fagocitose (Figura 4.15).

Tanto nas amostras de tartarugas não acometidas quanto nas de animais com FP, foi possível notar que os linfócitos apresentaram MIF maior na fagocitose que no *burst* oxidativo.

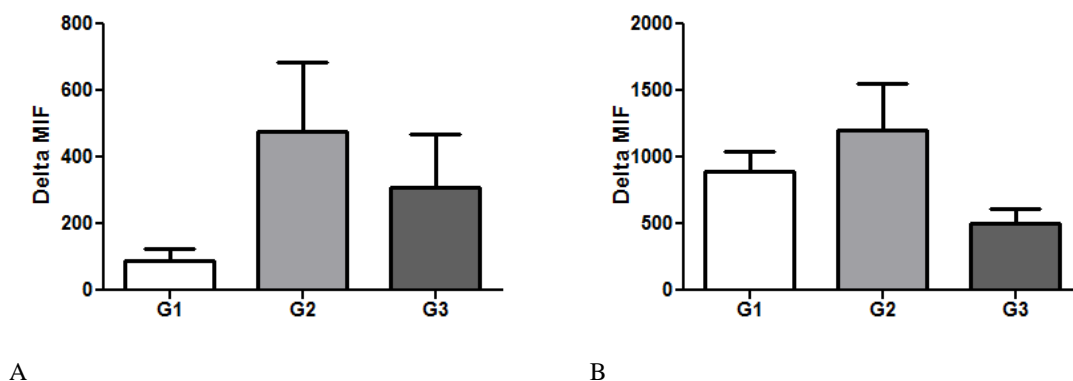


Figura 4.14 – Análise comparativa entre os deltas da média de intensidade de fluorescência (MIF) de linfócitos (R1), monócitos (R2) e granulócitos (R3) de tartarugas sem tumores. (A): *Burst* oxidativo e (B) Fagocitose

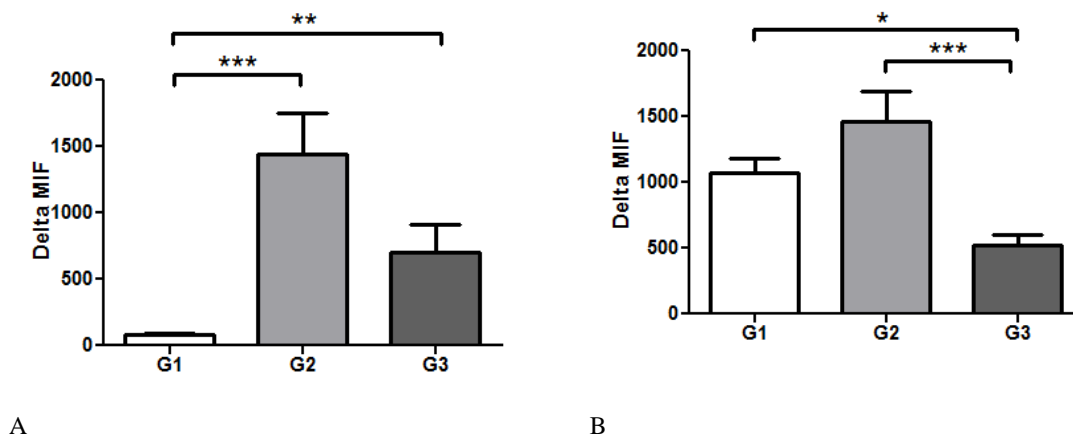


Figura 4.15 – Análise comparativa entre os deltas da média de intensidade de fluorescência (MIF) de linfócitos (R1), monócitos (R2) e granulócitos (R3) de tartarugas com tumores. (A): *Burst* oxidativo e (B) Fagocitose. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

#### 4.3.1.3 Correlações entre dados biométricos e deltas da atividade celular

Os resultados do delta da MIF das atividades celulares foram correlacionados com os dados biométricos: comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), massa corporal (MC) e índice de condição corporal (ICC) (ANEXO A).

Estas correlações foram feitas para as amostras de animais acometidos e sem tumores e foram realizadas pelo coeficiente de Spearman quando a distribuição dos dados não foi normal e de Pearson quando houve distribuição normal (Tabelas 4.2 e 4.3).

Tabela 4.2 – Valores de *r* para cada população celular analisada na fagocitose

Presença ou ausência de FP	Populações celulares	Valores de <i>r</i>		
		CCC	MC	ICC
Sem FP	Linfócitos	-0,4182	-0,3661	0,2636
	Monócitos	0,02727	0,1053	0,05098*
	Granulócitos	-0,35	-0,1765	0,4833
Com FP	Linfócitos	-0,1199	-0,3233	0,2189*
	Monócitos	-0,2090	-0,1643	0,06552
	Granulócitos	-0,2018	-0,08692	0,2536

Nota: \* Coeficiente de Pearson  
 FP: Fibropapilomatose  
 CCC: Comprimento curvilíneo da carapaça  
 MC: Massa corporal  
 ICC: Índice de condição corporal

Tabela 4.3 – Valores de *r* para cada população celular analisada no *burst* oxidativo

Presença ou ausência de FP	Populações celulares	Valores de <i>r</i>		
		CCC	MC	ICC
Sem FP	Linfócitos	-0,08571	-0,1765	-0,6
	Monócitos	-0,3	-0,3162	-0,1
	Granulócitos	-0,4	-0,3162	-0,2
Com FP	Linfócitos	0,03864	0,07270	0,1208
	Monócitos	0,6052	0,5580	-0,2025*
	Granulócitos	0,03395	0,008983	-0,2822*

Nota: \* Coeficiente de Pearson  
 FP: Fibropapilomatose  
 CCC: Comprimento curvilíneo da carapaça  
 MC: Massa corporal  
 ICC: Índice de condição corporal

#### 4.3.2 Parâmetros hematológicos

Embora seja indicado considerar a influência de fatores como local anatômico da punção venosa, idade das tartarugas, mecanismo de termorregulação, sexo (MCARTHUR; WILKINSON; MEYER, 2004), estado nutricional, condições ambientais, estação do ano e temperatura ambiente, a abordagem dos parâmetros hematológicos foi utilizada apenas como complemento aos resultados obtidos na análise da atividade celular (especialmente a contagem total e diferencial dos leucócitos). Desta forma, estes parâmetros não foram agrupados de acordo com a sazonalidade, o estado nutricional (dados não obtidos) e o sexo das tartarugas estudadas (todas eram juvenis e não há dimorfismo sexual externo nessa fase de desenvolvimento).

Cinquenta e oito amostras sanguíneas foram destinadas à análise dos parâmetros hematológicos (23 de animais não acometidos e 35 de tartarugas com tumores). Devido aos problemas com o transporte das amostras e com os equipamentos utilizados, algumas vezes não foi possível determinar todos os parâmetros de todas as amostras. A tabela 4.4 contém os valores mínimo, máximo, média e desvio padrão, além do número de amostras de tartarugas com e sem FP analisadas em cada parâmetro.

Tabela 4.4 – Valores dos parâmetros hematológicos analisados nas amostras de tartarugas com e sem fibropapilomatose (FP)

Parâmetros	Presença ou ausência de FP	N	Mínimo	Máximo	Média ± Desvio padrão	P
Hemácias ( $10^5$ )/mm <sup>3</sup>	Sem FP	23	0,25	15	3,7 ± 3,2	0,692
	Com FP	34	0,165	8,3	3,4 ± 2,3	
Leucócitos ( $10^3$ )/mm <sup>3</sup>	Sem FP	23	1,5	20,5	8 ± 4,7	0,095
	Com FP	35	2	26	10,5 ± 6,3	
Volume globular (%)	Sem FP	23	3	37	21 ± 9,4	0,602
	Com FP	35	4,5	35	20 ± 8,3	
Hemoglobina (g/dL)	Sem FP	22	0,6	12,8	5,6 ± 2,8	0,858
	Com FP	31	1,4	13,1	5,5 ± 2,8	
Proteína plasmática (g/dL)	Sem FP	22	0,2	4,4	2,2 ± 1,3	0,342
	Com FP	35	0,2	4,6	2,5 ± 1,2	

Cubas e Baptistotte (2007) reuniram dados indicando que o número médio de leucócitos de animais sem FP é menor ( $3.553,5 \pm 1.920,5/\text{mm}^3$ ) do que o encontrado nas análises das tartarugas verdes amostradas no presente estudo ( $8.000 \pm 4.700/\text{mm}^3$ ). Por outro lado, o valor médio de referência para hemoglobina foi maior ( $10 \pm 2$  g/dL) do que o obtido ( $5,6 \pm 2,8$  g/dL). Entretanto, vale ressaltar que os dados da referência foram obtidos de espécimes de *C. mydas* juvenis capturados em Fernando de Noronha/PE e os resultados deste estudo foram obtidos de animais mantidos no CReab-UBA. Dessa forma, a diferença de resultados pode ser explicada pela disponibilidade de recursos alimentares em cada local amostrado, idade, sexo, bem como atividades de deslocamento ou migração.

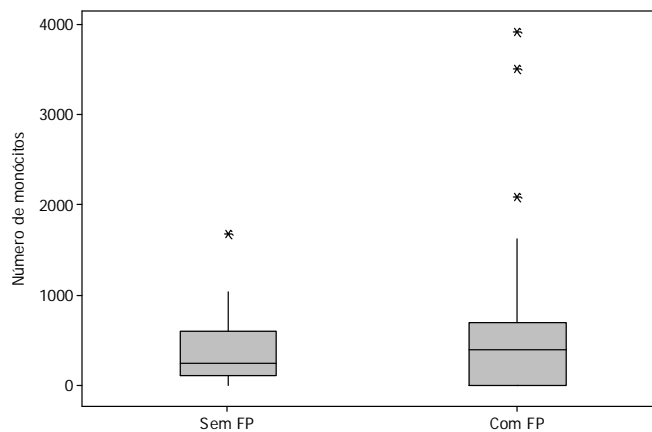
Como os dados dos índices hematimétricos não tiveram distribuição normal, foram analisados os valores mínimo, máximo, mediana e quartis (Tabela 4.5), porém não foram comparados com os valores de referência que registraram os valores médios.

Tabela 4.5 – Valores dos índices hematimétricos analisados nas amostras de tartarugas com e sem fibropapilomatose

Parâmetros	Presença ou ausência de FP	N	Mínimo	Máximo	Mediana [Q1; Q3]	P (W)
VCM	Sem FP	23	8,33	220	55,81 [40,38; 68]	0,4445 (714,5)
	Com FP	34	6,43	181,25	50 [37,44; 69,14]	
HCM	Sem FP	22	2	65,33	15,19 [12,34; 65,33]	0,8241 (595,5)
	Com FP	30	2	48,75	13,53 [9,49; 19,06]	
CHCM	Sem FP	22	18,21	36,67	26,45 [24,93; 29,78]	0,7866 (578,5)
	Com FP	31	23,2	43,33	26,9 [25; 30,91]	

Não foram encontradas diferenças entre animais com e sem FP assim como ocorreu nos estudos de Rossi (2007). Também não foi registrado aumento no nível de proteínas plasmáticas nos animais acometidos assim como foi relatado por Zwarg e colaboradores (2006).

As leituras das extensões sanguíneas permitiram uma adequada contagem diferencial dos leucócitos, sendo visualizados linfócitos, monócitos, heterófilos e eosinófilos. Apesar do número mediano de monócitos de animais acometidos ter sido maior que os de animais sem FP, não houve diferença entre estes grupos ( $P=0,7795$ ;  $W=433,5$ ) (Figura 4.16). O mesmo foi observado nas contagens de linfócitos ( $P=0,1132$ ;  $W=375$ ) e eosinófilos ( $P=0,1115$ ;  $W=376,5$ ) (Figuras 4.17 e 4.18 respectivamente). Por outro lado, o número mediano de heterófilos entre animais com e sem FP foi muito similar (6970 e 6400/ $\text{mm}^3$  respectivamente) ( $P=0,6079$ ;  $W=423$ ) (Figura 4.19).

Figura 4.16 – Boxplot do número de monócitos ( $/\text{mm}^3$ ) no sangue de tartarugas com e sem fibropapilomas (FP)

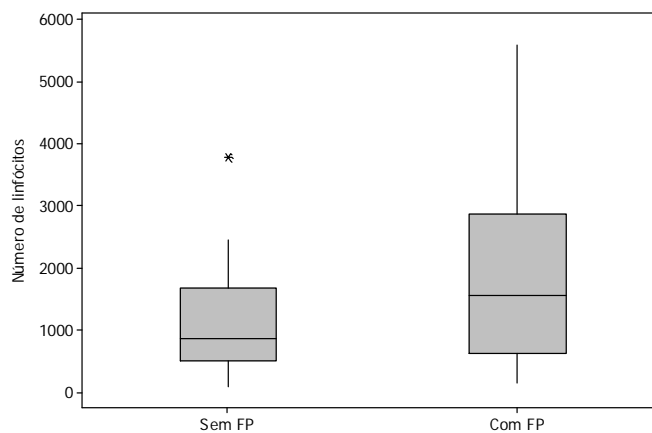


Figura 4.17 – Boxplot do número de linfócitos (/mm<sup>3</sup>) no sangue de tartarugas com e sem fibropapilomas (FP)

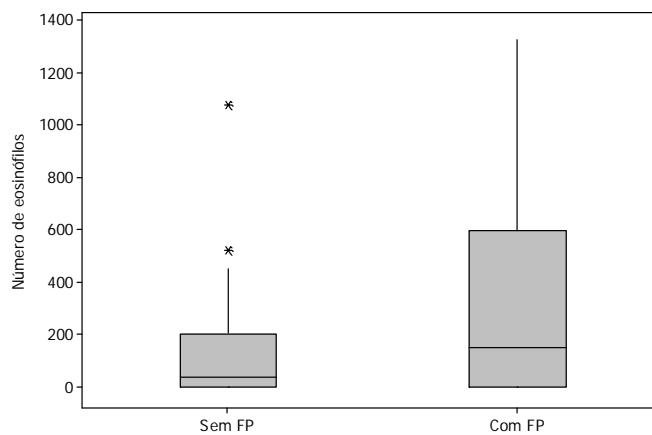


Figura 4.18 – Boxplot do número de eosinófilos (/mm<sup>3</sup>) no sangue de tartarugas com e sem fibropapilomas (FP)

Algumas espécies de tartarugas marinhas podem ter até 20% de eosinófilos na contagem diferencial (CAMPBELL, 2006). No caso dos espécimes de *C. mydas* amostrados, este fato não foi observado e foram relatadas medianas de apenas 1% para tartarugas sem FP e 2% no caso dos animais acometidos.



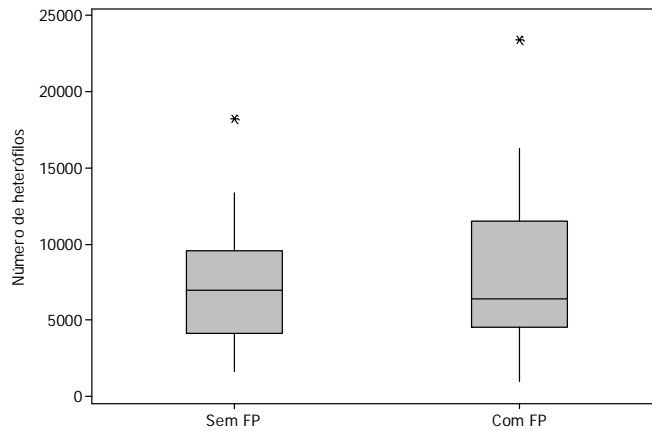


Figura 4.19 – Boxplot do número de heterófilos ( $/\text{mm}^3$ ) no sangue de tartarugas com e sem fibropapilomas (FP)

Os heterófilos foram quantificados em maior número (73% no caso das tartarugas com FP e 80% no caso das não acometidas). Estes resultados corroboram com estudos de Rossi (2007) ao analisar amostras sanguíneas de 47 tartarugas verdes capturadas em Ubatuba/SP. Por outro lado, estudos no Havá sobre morfologia e citoquímica de células sanguíneas de *Chelonia mydas* clinicamente normais, imaturas, em boa condição física e sem fibropapilomas, indicaram cinco tipos de leucócitos: linfócitos, monócitos, heterófilos, basófilos e eosinófilos. Assim como ocorre em muitos répteis terrestres e marinhos, os linfócitos foram os mais numerosos no sangue das tartarugas verdes (WORK et al., 1998).

Os números medianos de monócitos, linfócitos e eosinófilos foram maiores nos animais com FP do que nos não acometidos. A heterofilia e monocitose ocorrem em tartarugas verdes acometidas pela FP e isso pode ocorrer porque monócitos e heterófilos geralmente respondem juntos aos eventos fagocíticos (WORK; BALAZS, 1999; JOYNER et al., 2006).

Também foi analisada a razão heterófilos/linfócitos que já foi descrita para avaliação de estresse em frangos (GROSS; SEIGEL, 1983), doenças em tartarugas marinhas (AGUIRRE et al., 1995) e tem sido aplicada por outros pesquisadores. Embora tenha sido observado um valor mediano menor para animais acometidos (4,353) em comparação com os que não apresentavam a doença (9,111), não houve diferença entre os animais estudados ( $P=0,0725$ ;  $W=527,5$ ) (Figura 4.20).

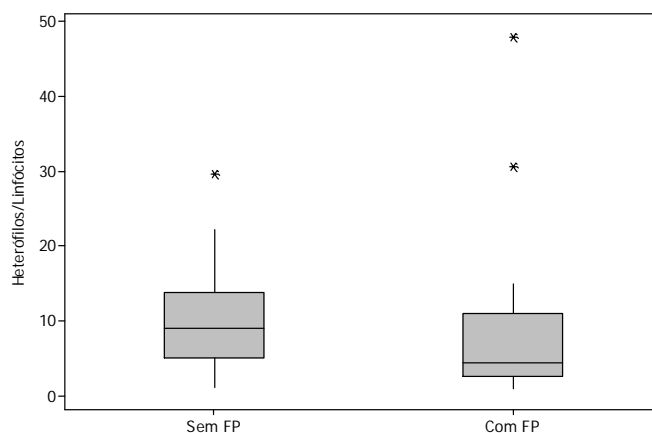


Figura 4.20 – Boxplot do da razão linfócitos/ heterófilos de tartarugas com e sem fibropapilomas (FP)

#### 4.3.3 Grau de severidade da doença e sua ausência

Foram realizadas análises entre o grau de severidade da doença e (1) dados biométricos, (2) parâmetros analisados no hemograma e (3) delta MIF da atividade celular. Estes testes foram importantes para uma melhor avaliação dos parâmetros analisados de acordo com o FPS.

As análises foram realizadas mesmo considerando o número reduzido de tartarugas classificadas no escore 3 (apenas 2 animais). A tabela 4.6 contém o número de tartarugas analisadas nos diferentes parâmetros de acordo com o FPS e sua ausência.

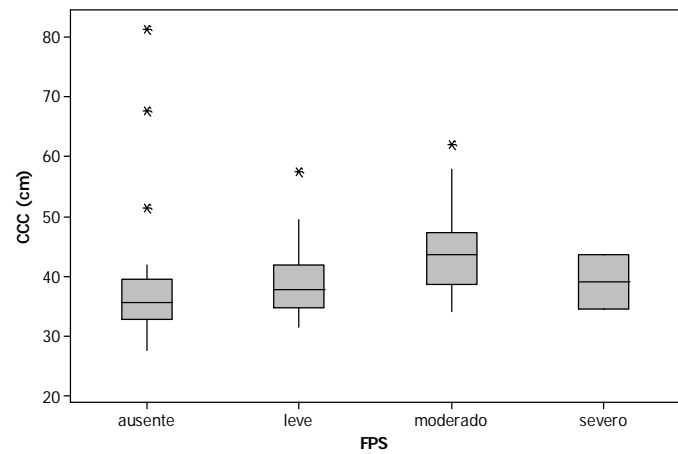
Tabela 4.6 – Número de tartarugas verdes em cada escore de severidade da fibropapilomatose (FPS) e os parâmetros analisados

Parâmetros	Número de tartarugas de acordo com o FPS e sua ausência			
	0	1	2	3
CCC (cm)	23	12	12	2
MC (kg)	23	12	12	2
ICC	23	12	12	2
Volume globular	23	12	12	2
Hemácias (He)	23	11	12	2
Leucócitos (Leu)	23	12	12	2
Hemoglobina (Hb)	23	11	12	2
Proteína plasmática (Prot pl)	22	12	12	2
Linfócitos (Lin)	17	12	10	2
Monócitos (Mon)	17	12	10	2
Heterófilos (Het)	17	12	10	2
Eosinófilos (Eos)	17	12	10	2
Delta MIF fagocitose de R1	11	11	10	...
Delta MIF fagocitose de R2	11	12	10	...
Delta MIF fagocitose de R3	9	10	8	...
Delta MIF <i>burst</i> oxidativo de R1	6	6	6	...
Delta MIF <i>burst</i> oxidativo de R2	5	5	5	...
Delta MIF <i>burst</i> oxidativo de R3	4	6	6	...

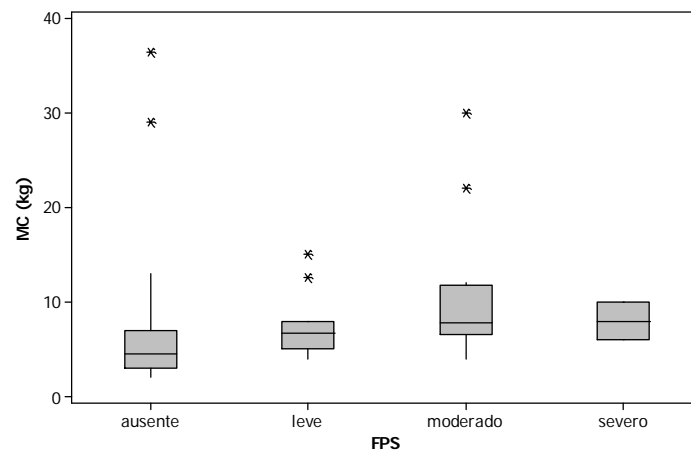
Nota: FPS: escore da fibropapilomatose, sendo 0 (ausência de FP), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (severo).

...: Valor numérico nulo

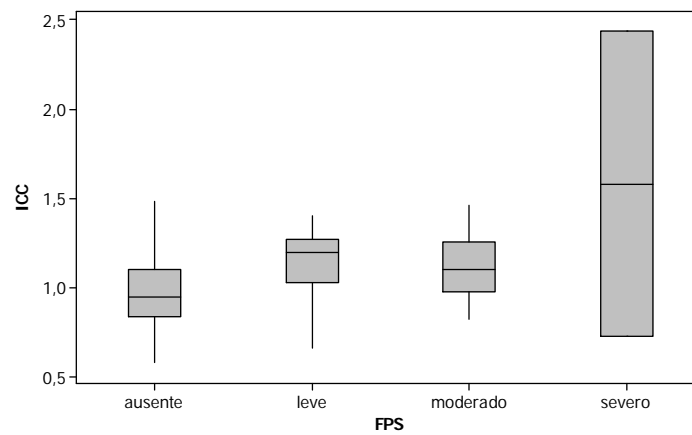
Embora o teste estatístico não tenha indicado diferença na análise entre os valores biométricos e o FPS e sua ausência, as tartarugas classificadas no escore moderado tiveram CCC mediano maior que as demais (43,5 cm). Por outro lado, animais classificados no grau severo (FPS 3) apresentaram ICC mediano maior que as dos outros grupos (1,58) (Figura 4.21 A, B e C).



(A)



(B)



(C)

Figura 4.21 – Boxplot dos valores biométricos de acordo com os escores de fibropilomatose (FPS) e sua ausência. (A) Comprimento curvilíneo da carapaça, (B) Massa corporal e (C) Índice de condição corporal

Nota: CCC: Comprimento curvilíneo da carapaça; MC: Massa corporal; ICC: Índice de condição corporal FPS: escore da fibropilomatose

Apesar da proposta FPS ainda estar em desenvolvimento, as análises revelaram resultados interessantes. Pôde-se destacar que as tartarugas classificadas no escore moderado tiveram CCC mediano maior que as demais e que os animais classificados no grau severo apresentaram ICC mediano maior que dos demais grupos.

Também não houve diferença entre os animais classificados nos escores 0, 1 e 2 na análise dos linfócitos ( $P=0,375$ ), monócitos ( $P=0,572$ ) e granulócitos ( $P=0,592$ ) (Figuras 4.22A, 4.23A e 4.24A respectivamente). Entretanto, os números medianos de monócitos e de linfócitos foram maiores nas tartarugas classificadas no escore 1, dos heterófilos foi maior nos animais contidos no escore 3 e a razão mediana heterofilo:linfócito foi maior nas tartarugas não acometidas (ANEXO B).

Ao se analisar o *burst* oxidativo dos linfócitos observou-se que os animais classificados no escore 1 tiveram MIF mediana maior que os demais (Figura 4.22B), embora não haja diferença ( $P=0,738$ ). Por outro lado, a análise do *burst* oxidativo dos monócitos indicou que tartarugas classificadas no escore 2 apresentaram MIF mediana maior que as demais (Figura 4.23B;  $P=0,065$ ). Também não houve diferença entre os animais classificados nos escores 0, 1 e 2 na análise dos granulócitos (Figura 4.24B;  $P=0,718$ ).

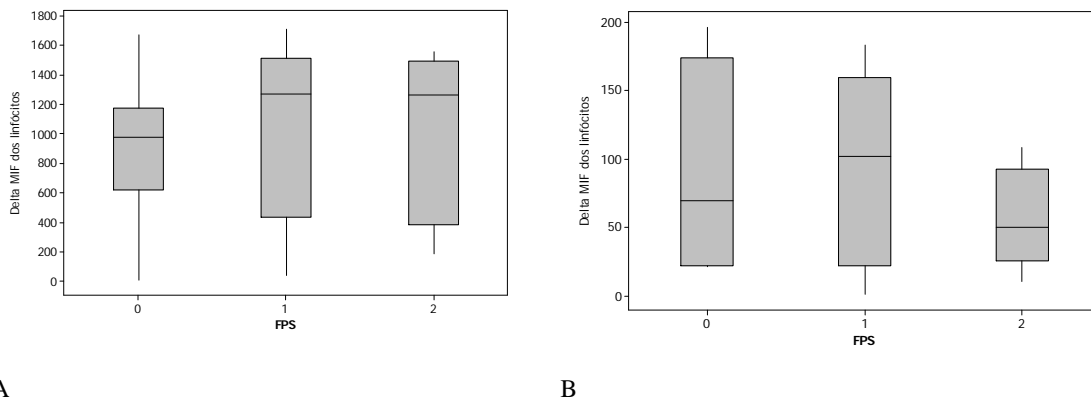


Figura 4.22 – Boxplot da média de intensidade de fluorescência (MIF) dos linfócitos de acordo com os escores de fibropapilomatose e sua ausência (FPS). (A) Fagocitose e (B) *Burst* oxidativo

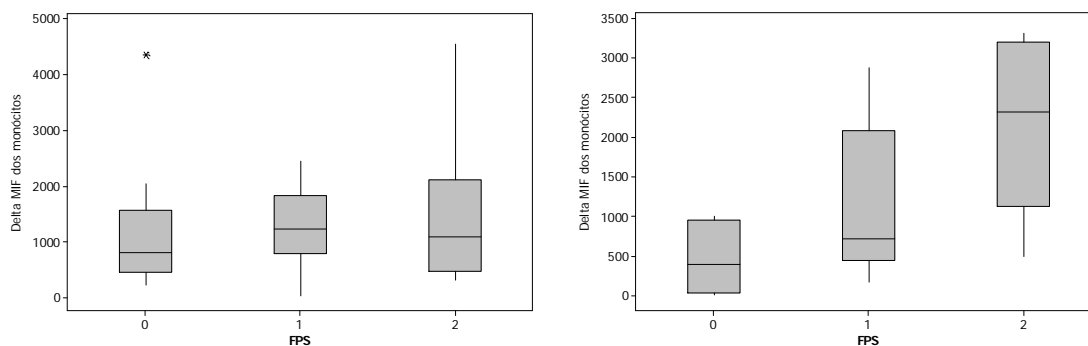


Figura 4.23 – Boxplot da média de intensidade de fluorescência (MIF) dos monócitos de acordo com os escores de fibropapilomatose e sua ausência (FPS). (A) Fagocitose e (B) *Burst* oxidativo

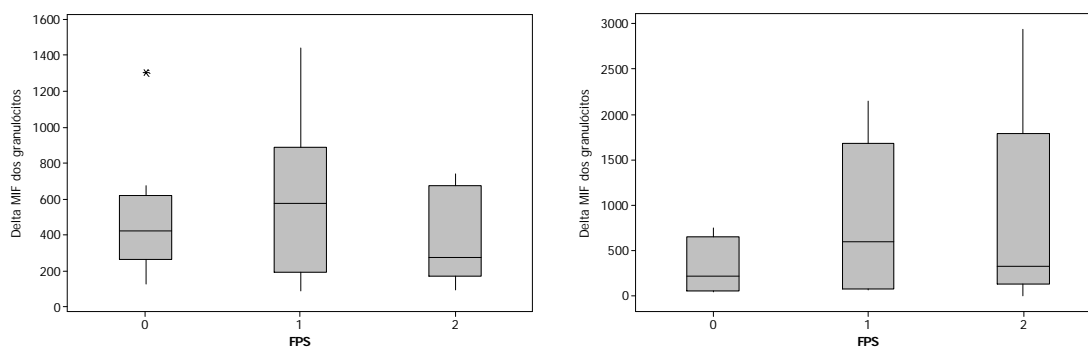


Figura 4.24 – Boxplot da média de intensidade de fluorescência (MIF) dos granulócitos de acordo com os escores de fibropapilomatose e sua ausência. (A) Fagocitose e (B) *Burst* oxidativo

#### 4.4 Conclusões

O Percoll<sup>TM</sup> demonstrou ter sido eficaz na separação dos mononucleares e granulócitos, permitindo a análises destes grupos celulares. Os leucócitos responderam melhor ao estímulo aplicado na avaliação da fagocitose do que na do *burst* oxidativo. A proposta de escores da FP pôde ser analisada considerando os dados biométricos, hematológicos e imunológicos, proporcionando avanços na compreensão da doença. A citometria de fluxo é uma importante ferramenta aplicada na pesquisa científica, possibilitando que os resultados adquiridos sejam adicionados a outros conhecimentos contribuindo para questões relacionadas à Biologia e Medicina da Conservação.

## Referências

- 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.
- AFFONSO, S. F. **Efeitos tóxicos sobre a imunidade inata do peixe *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) causados por um hidrocarboneto poliaromático (naftaleno): avaliação por citometria de fluxo.** 2006. 117 p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- 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.; SPRAKER, T.R.; BALAZS, G.H.; ZIMMERMAN, B. Spirorchids and fibropapillomas in green turtles from the Hawaiian Islands. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 34, n. 1, p. 91-98, 1998.
- AZEVEDO; F.A.; CHASIN, A.A.M. (Coord.). **As bases toxicológicas da eotoxicologia.** São Carlos: RiMa; São Paulo: InterTox, 2004. 322 p.
- CAMPBELL, T.W. Hematologia de répteis. In: BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. (Ed). **Hematologia e bioquímica clínica veterinária.** Tradução de J.J. Fagliari e D.S. Fagliari. São Paulo: Roca, [2006]. p. 248-264.
- CUBAS, P.H.; BAPTISTOTTE, C. Chelonia (Tartaruga, Cágado, Jabuti). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária.** São Paulo: Roca, 2007. p. 86-119.
- CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes assessment by flow cytometry and microscopy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 71, p. 161-171, 1999.
- 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.
- GENOY-PUERTO, A.E. **Citometria de fluxo de leucocitos sanguíneos de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) provenientes de ambientes poluídos: metodologia de isolamento e estimulação.** 2008. 104 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- GOTTDENKER, N.L.; JACOBSON, E.R. Effect of veinpuncture sites on hematologic and clinical biochemical values in desert tortoises (*Gopherus agassizii*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 56, n. 1, p. 19-21, 1995.

GROSS, W.B.; SEIGEL, H.S. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 27, n. 4, p. 972-979, 1983.

HIRTH, H.F. **Synopsis of the biological data on green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758)**. Washington: U.S. Fish and Wildlife Service, 1997. 126 p.

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

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

JOYNER, P.H.; SHREVE, A.A.; SPAHR, J.; FOUNTAIN, A.L.; SLEEMAN, J.M. Phaeohyphomycosis in a free-living eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 42, n.4, p. 883-888, 2006.

KUMAR, S.; RAI, U. Dynorphin regulates the phagocytic activity of splenic phagocytes in wall lizards: involvement of a  $\kappa$ -opioid receptor-coupled adenylate-cyclase-cAMP-PKA pathway. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 214, p. 4217-4222, 2011.

LABRADA-MARTAGÓN, V.; RODRÍGUEZ, P.A.T.; MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, L.C.; ZENTENO-SAVÍN, T. Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, Oxford, v. 154, p. 65-75, 2011.

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.

MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders, 1996. 1264 p.

MARCOVALDI, M.A.A.G.D.; SANTOS, A.S. dos; SALES, G. (Org.). Ameaças às tartarugas marinhas. In: \_\_\_\_\_. **Plano de Ação Nacional para Conservação das Tartarugas Marinhas**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011. pt. 1, p. 48-55. (Série Espécies Ameaçadas, 25).

McARTHUR, S.; WILKINSON, R.; MEYER, J. **Medicine and surgery of tortoises and turtles**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. 600 p.

MUÑOZ, F.A.; ESTRADA-PARRA, S.; ROMERO-ROJAS, A.; WORK, T.M., GONZALEZ-BALLESTEROS, E.; ESTRADA-GARCIA, I. Identification of CD3+ T lymphocytes in the green turtle *Chelonia mydas*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 131, n. 3/4, p. 211-217, 2009.



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

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

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

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

ROSSI, S. **Estudo do impacto da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758) (Testudines, Cheloniidae)**. 2007. 104 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ROSSI, S.; SÁ-ROCHA, V.M.; KINOSHITA, D.; GENOY-PUERTO, A.; ZWARG, T. WERNECK, M.R.; SÁ-ROCHA, L.C.; MATUSHIMA, E.R. Flow cytometry as a tool in the evaluation of blood leukocyte function in *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Cheloniidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n. 3, p. 899-905, 2009.

ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G.; BAPTISTOTTE, C.; LIMA, E.H.S.M.; BECKER, J.H.; MATUSHIMA, E.R. Establecimiento de escores para determinar el grado de severidad de la fibropapilomatosis en *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) capturadas en la costa brasileira. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE REABILITAÇÃO DE FAUNA MARINHA, 2., 2012, Rio Grande. **Resumos...** Rio Grande: CRAM-Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG-Aiuká, 2012a. p. 161.

ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; VALE, L.A.S.; GENOY-PUERTO, E.A.; KINOSHITA, D.; HAZARBASSANOV, N.G.T.Q.; BECKER, J.H.; MATUSHIMA, E.R. Contributions of flow cytometry and gas chromatography for conservation of *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) in Brazil. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE REABILITAÇÃO DE FAUNA MARINHA, 2., 2012, Rio Grande. **Resumos...** Rio Grande: CRAM-Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG-Aiuká, 2012b. p. 126.

ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G.; MATUSHIMA, E.R. A proposal to objectively classify fibropapillomatosis severity in sea turtles considering number and size of tumors. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 33., 2013, Baltimore. **Abstracts...** Miami: U.S. Department of Commerce- NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-645, 2013a. p. 27.

ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; HAZARBASSANOV, N.G.T.Q.; GENOY-PUERTO, E.A.; KINOSHITA, D.; MATUSHIMA, E.R. Immunosuppression Evaluation of *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) Caught in Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 33., 2013,

Baltimore. **Abstracts...** Miami: U.S. Department of Commerce- NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-645, 2013b. p. 26.

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

SILVA, F.R. **Efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos de ratos avaliados por citometria de fluxo**. 2003. 179 p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SPOTILA, J.R. **Sea turtles: a complete guide to their biology, behaviour and conservation**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press and Oakwood Arts, 2004. 227 p.

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

VALDIVIA, P.A.; ZENTENO-SAVÍN, T.; GARDNER, S.C.; AGUIRRE, A.A. Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizii*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, Oxford, v. 146, p. 111-117, 2007.

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, n. 4, p. 804-807, Oct. 1999.

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

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.

ZHANG, F.; GU, H.; LI, P. A review of chelonian hematology. **Asian Herpetological Research**, v. 2, n. 1, p. 12-20, 2011.

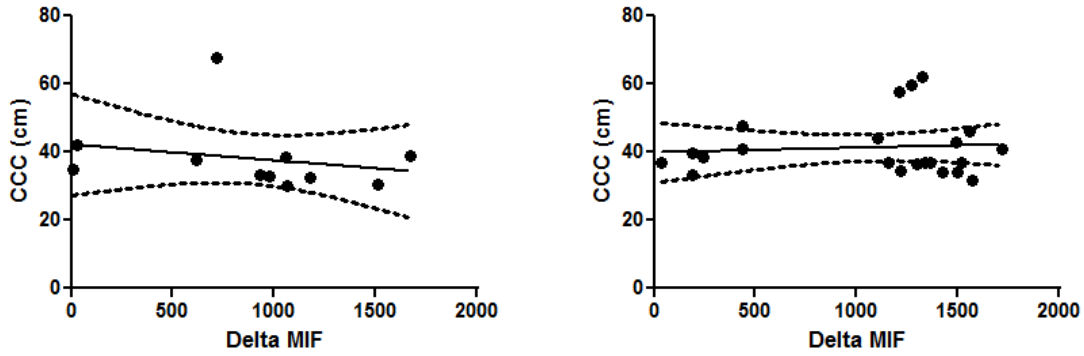
ZIMMERMAN, L.M.; VOGEL, L.A.; EDWARDS, K.A.; BOWDEN, R.M. Phagocytic B cells in a reptile. **Biology Letters**, London, v. 6, p. 270-273, 2010.

ZWARG, T.; ROSSI, S.; SANCHES, T.C.; ZIMOVSKI, I.M.; CASAGRANDE, R.A.; CESAR, M.O.; WERNECK, M.R.; MATUSHIMA, E.R. Avaliação do perfil hematológico de tartaruga verde (*Chelonia mydas*) (Testudines, Cheloniidae) com e sem fibropapilomatose do litoral norte do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO, 10.; ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 15., São Pedro. **Anais...** São Pedro: ABRAVAS, 2006. p. 35.

Anexos

Anexo A

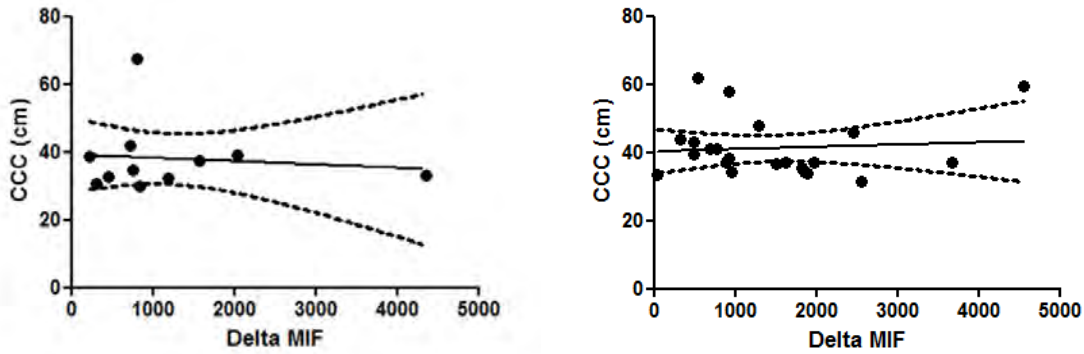
1 Correlações entre dados biométricos e delta MIF da fagocitose



A

B

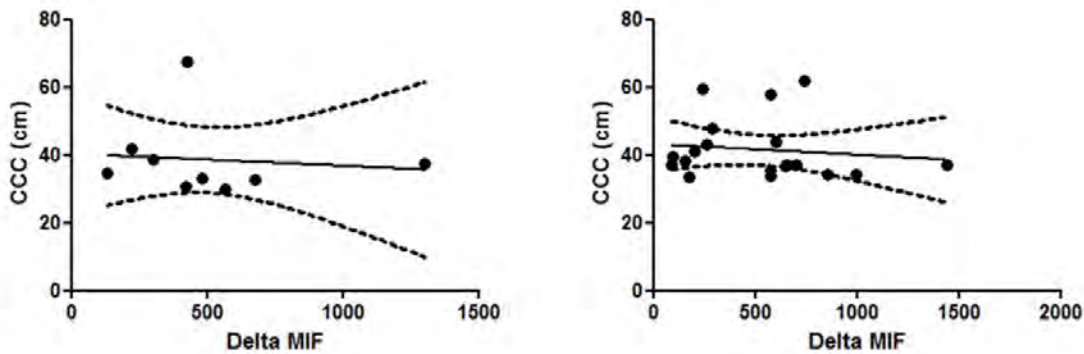
Figura 1 – Correlação entre CCC e delta MIF dos linfócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = -0,4182$ ); (B) *C. mydas* com tumores ( $r = -0,1199$ )



A

B

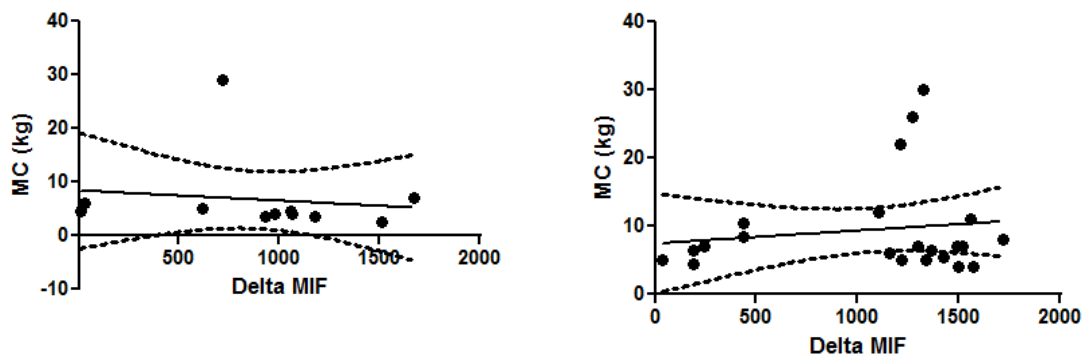
Figura 2 – Correlação entre CCC e delta MIF dos monócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = 0,02727$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = -0,2090$ )



A

B

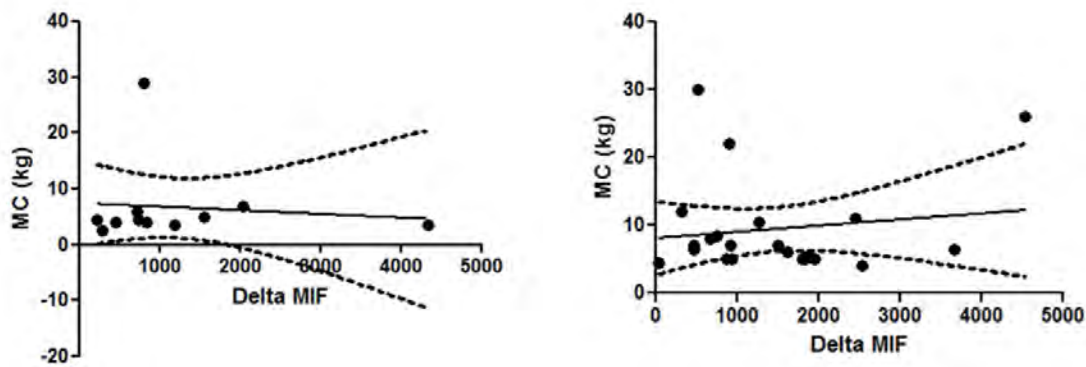
Figura 3 – Correlação entre CCC e delta MIF dos granulócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = -0,35$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = -0,2018$ )



A

B

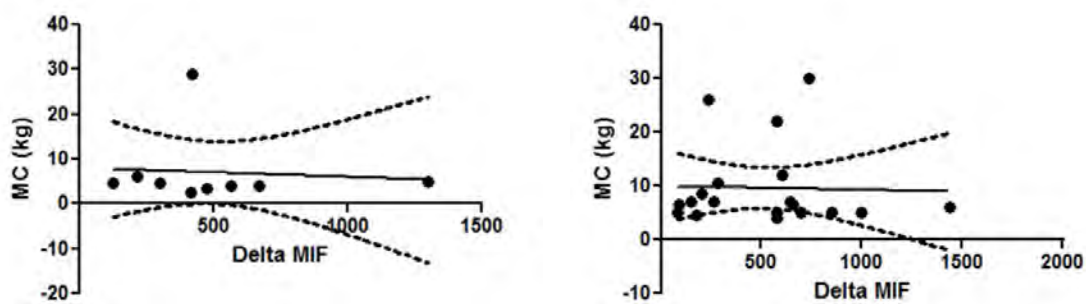
Figura 4 – Correlação entre MC e delta MIF dos linfócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = -0,3661$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = -0,3233$ )



A

B

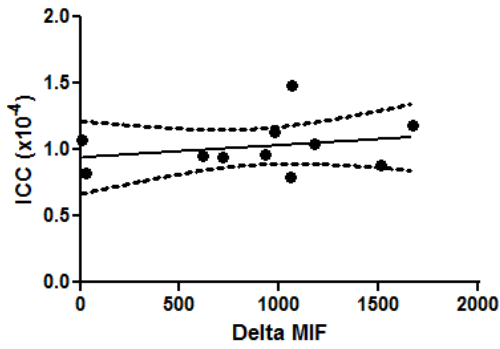
Figura 5 – Correlação entre MC e delta MIF dos monócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = 0,1053$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = -0,1643$ )



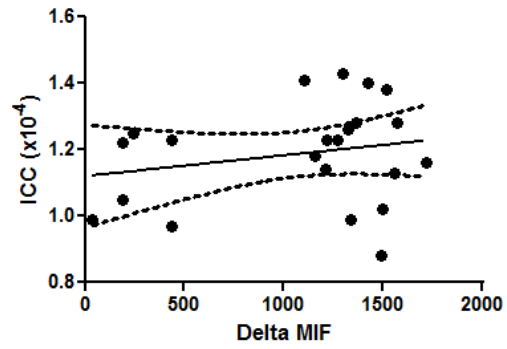
A

B

Figura 6 – Correlação entre MC e delta MIF dos granulócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = -0,1765$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = -0,08692$ )

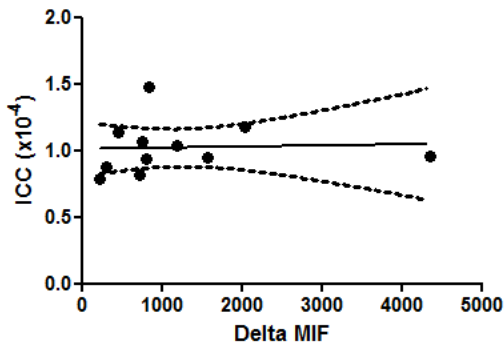


A

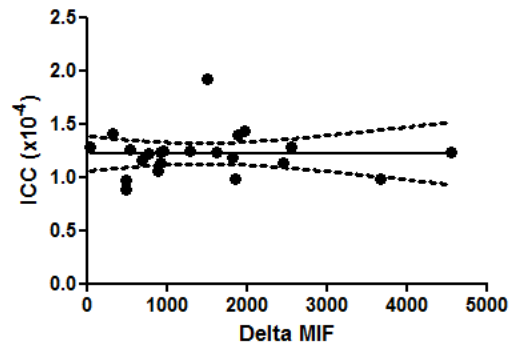


B

Figura 7 – Correlação entre ICC e delta MIF dos linfócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = 0,2636$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = 0,2189$ )

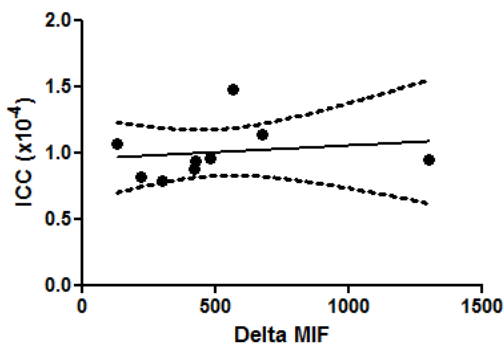


A

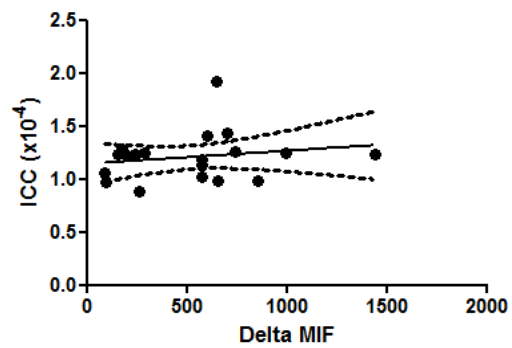


B

Figura 8 – Correlação entre ICC e delta MIF dos monócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = 0,05098$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = 0,06552$ )



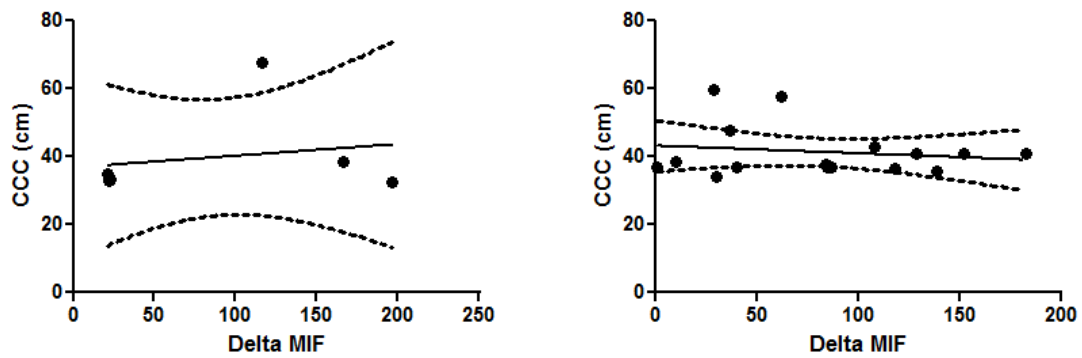
A



B

Figura 9 – Correlação entre ICC e delta MIF dos granulócitos. (E) *C. mydas* sem tumores ( $r = 0,4833$ ) e (F) *C. mydas* com tumores ( $r = 0,2536$ )

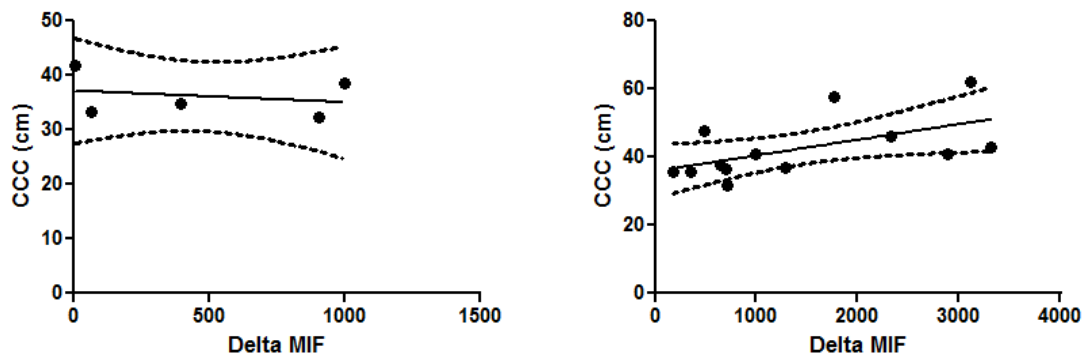
## 2 Correlações entre dados biométricos e *burst* oxidativo



A

B

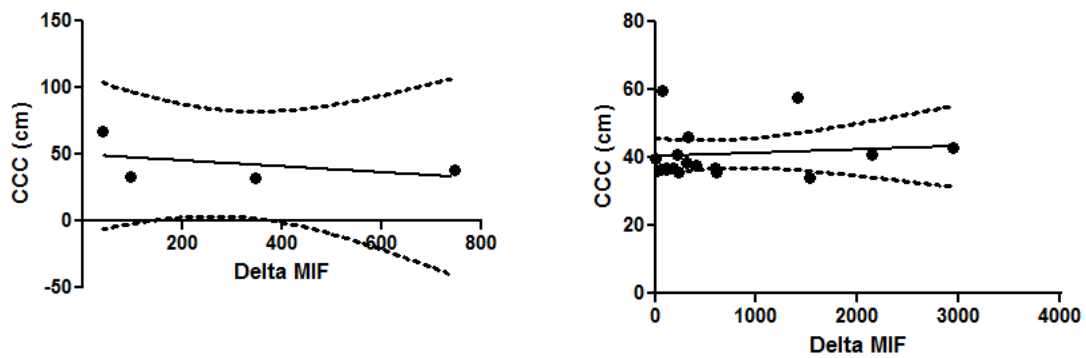
Figura 10 – Correlação entre CCC e delta MIF dos linfócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = -0,08571$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = -0,03864$ )



A

B

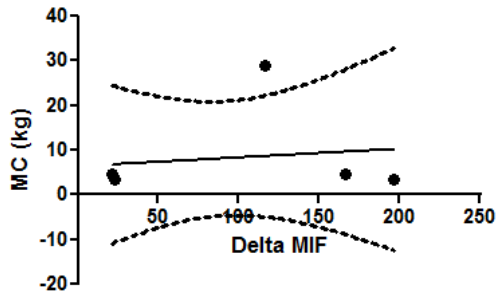
Figura 11 – Correlação entre CCC e delta MIF dos monócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = -0,3000$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = 0,6052$ )



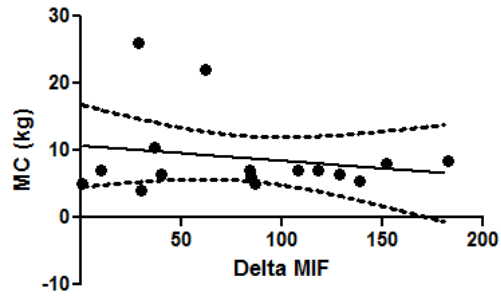
A

B

Figura 12 – Correlação entre CCC e delta MIF dos granulócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = -0,4000$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = 0,03395$ )

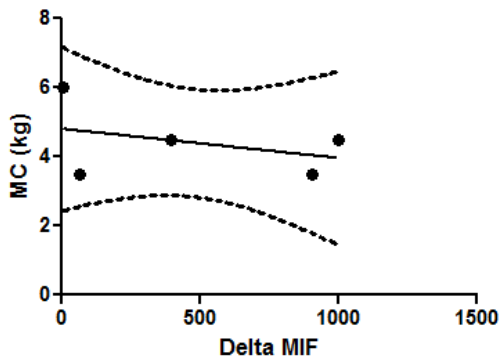


A

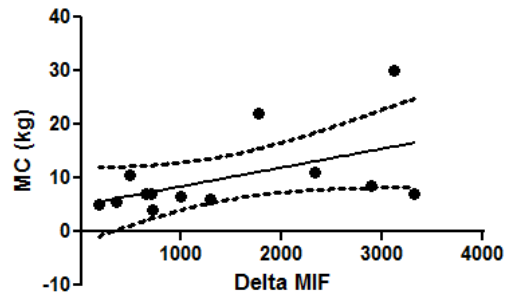


B

Figura 13 – Correlação entre MC e delta MIF dos linfócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = -0,1765$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = 0,07270$ )

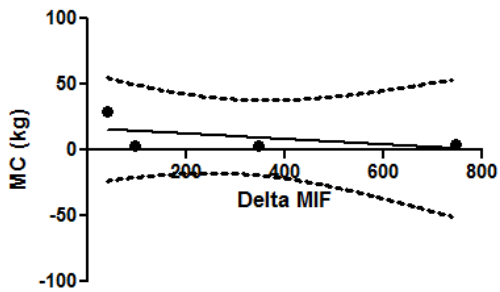


A

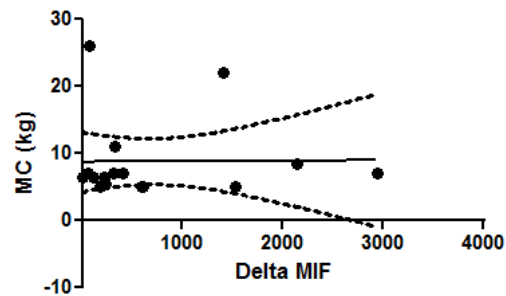


B

Figura 14 – Correlação entre MC e delta MIF dos monócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = -0,3162$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = 0,5580$ )

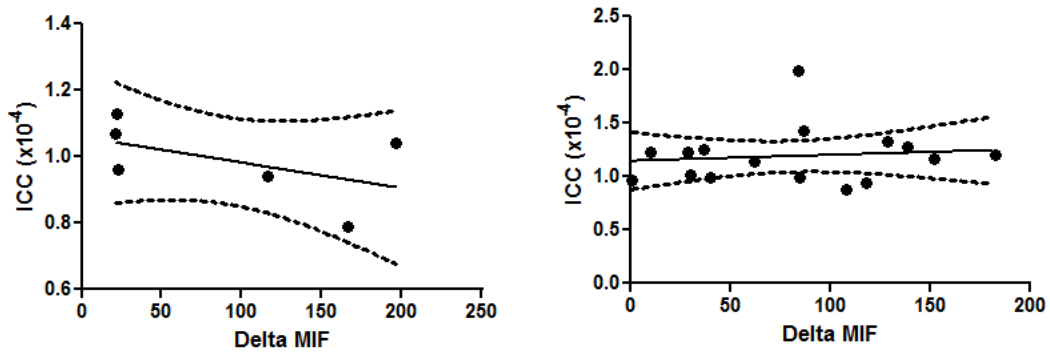


A



B

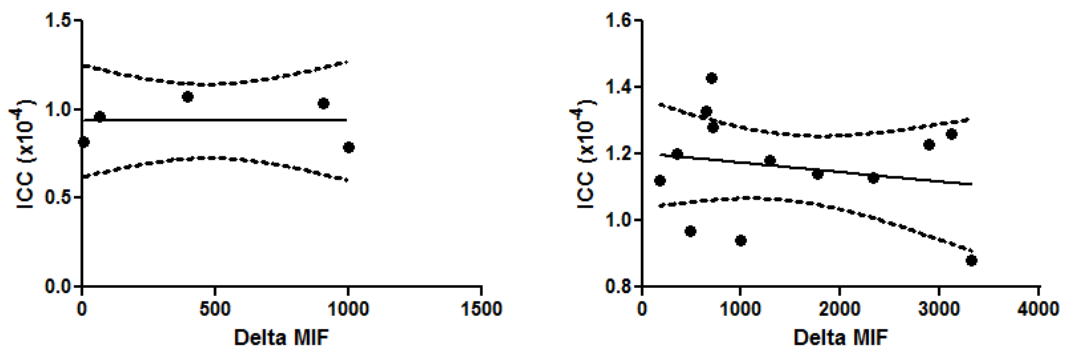
Figura 15 – Correlação entre MC e delta MIF dos granulócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = -0,3162$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = 0,008983$ )



A

B

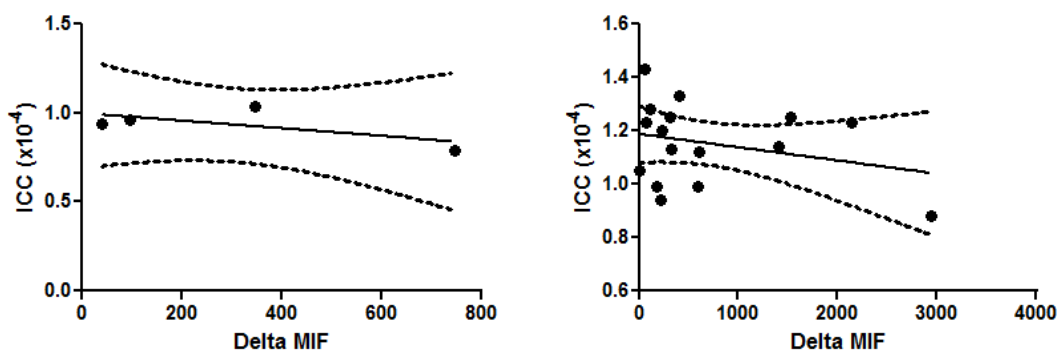
Figura 16 – Correlação entre ICC e delta MIF dos linfócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = -0,6000$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = 0,1208$ )



A

B

Figura 17 – Correlação entre ICC e delta MIF dos monócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = -0,1000$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = -0,2025$ )



A

B

Figura 18 – Correlação entre ICC e delta MIF dos granulócitos. (A) *C. mydas* sem tumores ( $r = -0,2000$ ) e (B) *C. mydas* com tumores ( $r = -0,2822$ )



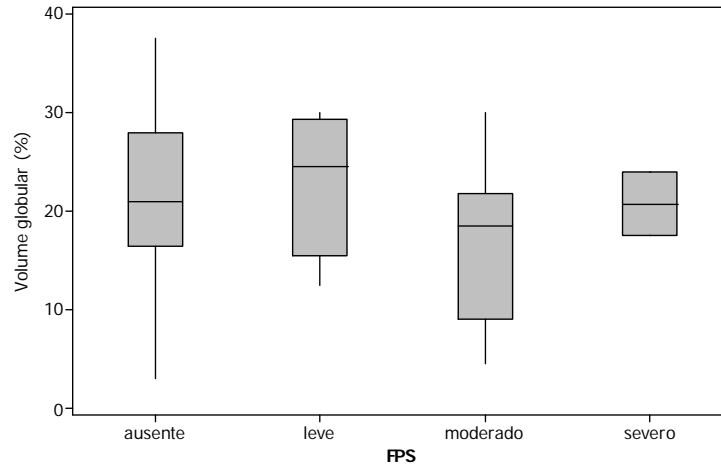
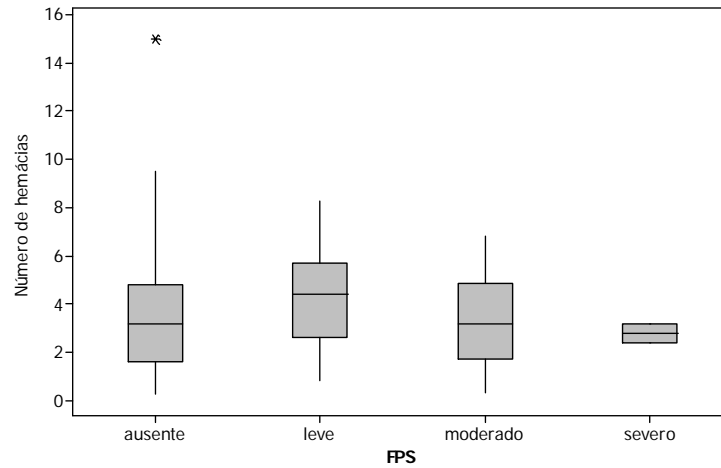
**Anexo B****Análises entre parâmetros hematológicos e grau de severidade da FP**

Figura 1 – Boxplot do volume globular de acordo com os escores de fibropilomatose (FPS) e sua ausência

Figura 2 – Boxplot do número de hemácias ( $10^5$ ) de acordo com os escores de fibropilomatose (FPS) e sua ausência

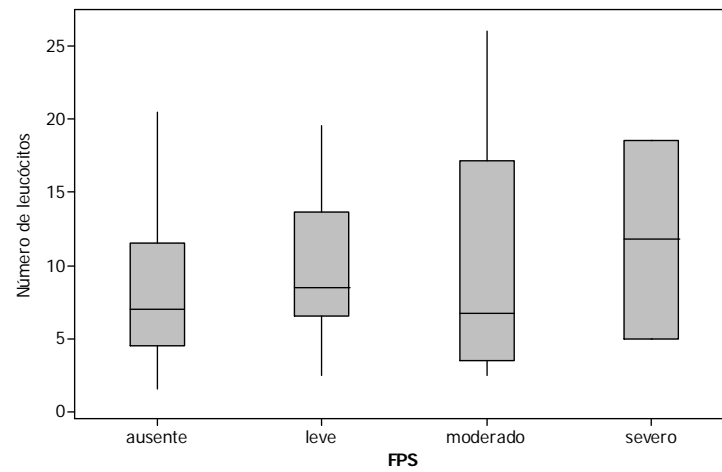


Figura 3 – Boxplot do número de leucócitos ( $10^3$ ) de acordo com os escores de fibropapilomatose e sua ausência

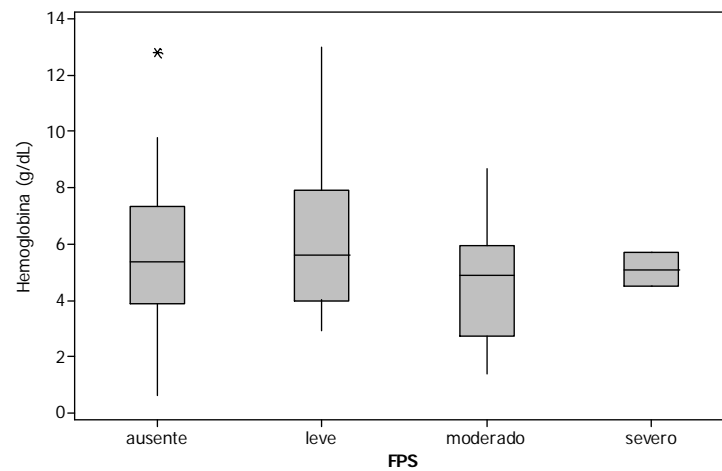


Figura 4 – Boxplot da hemoglobina (Hb) de acordo com os escores de fibropapilomatose e sua ausência

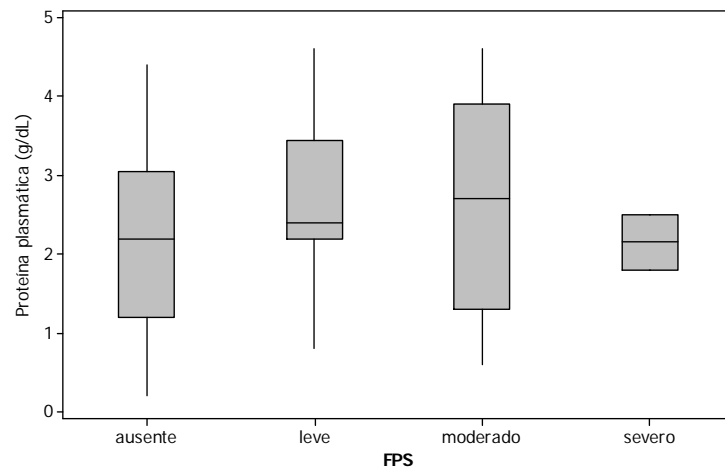


Figura 5 – Boxplot da proteína plasmática de acordo com os escores de fibropapilomatose e sua ausência

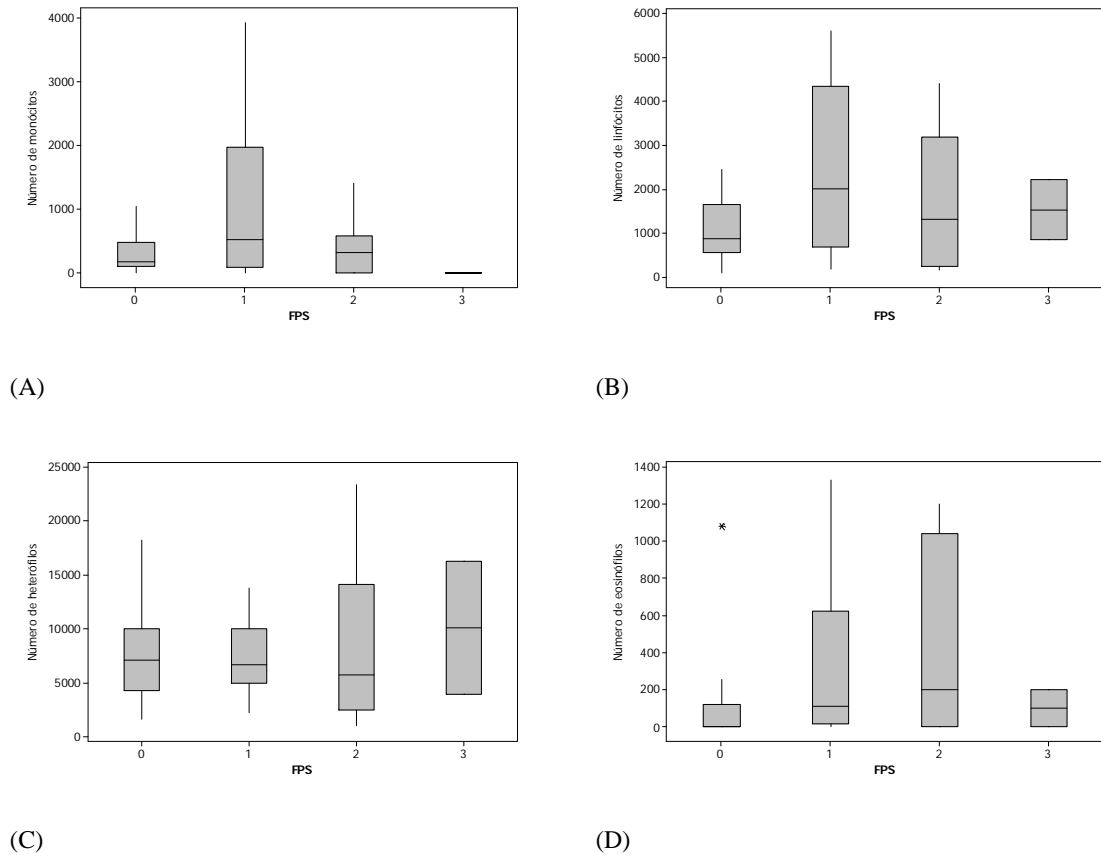


Figura 6 – Boxplot do número diferencial de leucócitos de acordo com os escores de fibropapilomatose e sua ausência. (A) Monócitos, (B) Linfócitos, (C) Heterófilos, (D) Eosinófilos

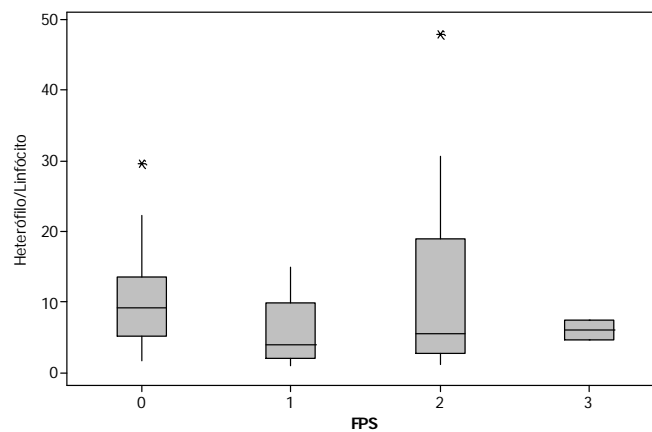


Figura 7 – Boxplot da razão heterófilo/linfócito de acordo com os escores de fibropapilomatose e sua ausência

## Apêndice

### SOLUÇÕES E REAGENTES

#### 1 Lista de soluções e reagentes utilizados

- Metanol PA (Merck<sup>®</sup>);
- Solução corante May-Grünwald (Merck<sup>®</sup>)-Giemsa;
- Reagente Natt & Herrick;
- Reagente de cor para hemoglobina (Labtest<sup>®</sup>);
- Meio de cultura RPMI1640 (Gibco<sup>®</sup>, LifeTechnologies<sup>™</sup>, EUA)
- *Phosphate-buffered saline* (PBS);
- Percoll<sup>™</sup> (GE-Healthcare Bio-Sciences, Suécia)
- Solução de Hanks 1x e 10x (Gibco<sup>®</sup>, LifeTechnologies<sup>™</sup>, EUA);
- Azul de Tripán 0,4% (Sigma<sup>®</sup>);
- Miristato-acetato de forbol (PMA) (Calbiochem<sup>®</sup>);
- DCFH (2'7' diclorofluoresceína) (Molecular Probes<sup>®</sup>);
- Zymosan A (*Saccharomyces cerevisiae*) BioParticles<sup>®</sup>, Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 conjugate;
- EDTA 3mM (Sigma<sup>®</sup>, EUA).

#### 2 Preparação das soluções e reagentes

##### a) Reagente de cor para hemoglobina (Labtest<sup>®</sup>)

Reagente de cor do kit Labtest <sup>®</sup> .....	10 mL
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....	1000 mL

##### b) Solução corante May-Grünwald (Merck<sup>®</sup>)-Giemsa (técnica de Rosenfeld)

Giemsa em pó.....	0,97 g
May-Grünwald em pó.....	0,53 g
Metanol PA (Merck <sup>®</sup> ) q.s.p. ....	1000 mL

## c) Reagente Natt &amp; Herrick

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

d) *Phosphate-buffered saline* (PBS)

- Solução estoque 10x (concentrada):

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

- Solução de uso 1x (diluída):

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

e) Azul de Tripán 0,4% (Sigma<sup>®</sup>)

Azul de Tripán.....	4 g
H <sub>2</sub> O destilada.....	96 mL

f) Miristato-acetato de forbol (PMA) (Calbiochem<sup>®</sup>)

Solução estoque de PMA (100 ng/100 µL).....	1 µL
PBS 1x.....	999 µL

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

g) DCFH (Molecular Probes<sup>®</sup>) solução estoque 25 mM

DCFH-DA.....	28,35 mg
Etanol PA.....	2 mL

- ❖ Descongelar imediatamente antes do uso.

h) Zymosan A (*Saccharomyces cerevisiae*) BioParticles<sup>®</sup>, Alexa Fluor<sup>®</sup>594 conjugate:

Zymosan BioParticles<sup>®</sup>, Alexa Fluor<sup>®</sup>594 conjugate..... 2 mg

PBS 1x estéril..... 2 mL

Obs.: Tanto a solução preparada quanto o reagente em pó foram mantidos em temperatura de -18° C e protegidos da luz. A solução preparada foi acondicionada em *ependorfs* contendo alíquotas de 20 µL cada.

i) EDTA 3mM (Sigma<sup>®</sup>,USA)

EDTA..... 0,56g

PBS 1x.....500 mL

Obs.: Mantido protegido da luz e sob refrigeração.

j) Percoll<sup>™</sup> com solução de Hanks

A solução estoque foi preparada com solução de Hanks 10x (9:1, Percoll:Hanks), no volume desejado.

Depois, com a solução de Hanks 1x, ajustou-se a porcentagem (57%): 57% Solução estoque – Percoll e 43% Solução Hanks 1x.

## 5 ANÁLISE DE BIFENILAS POLICLORADAS EM AMOSTRAS SANGUÍNEAS DE *Chelonia mydas* (TESTUDINES, CHELONIIDAE) (LINNAEUS 1758) CAPTURADAS EM ÁREAS DE ALIMENTAÇÃO E REPRODUÇÃO DO BRASIL

### Resumo

A tartaruga verde (*Chelonia mydas*) pode ser encontrada ao longo da costa do Brasil, em ilhas ou atóis. A fibropapilomatose (FP), doença caracterizada por tumores cutâneos benignos, é uma ameaça significativa para a conservação desta espécie e tem uma etiologia complexa e multifatorial envolvendo o *Chelonid Fibropapilloma-associated Herpesvirus* e fatores genéticos e ambientais. As bifenilas policloradas (PCBs) são consideradas poluentes ambientais imunossupressores e carcinogênicos e devido a este fato, este estudo teve como objetivo investigar a presença de sete congêneres de PCBs (prioritários pela legislação europeia: PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180) em amostras sanguíneas de tartarugas com e sem FP, usando cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (GC- $\mu$ ECD). As amostras sanguíneas foram coletadas de 80 espécimes (59 sem FP e 21 com FP) capturadas nas áreas de alimentação: Ubatuba/SP (UBA) (N=14, das quais 6 tartarugas com FP), Almofala/CE (ALM) (N=12, sendo 3 acometidas), Vitória/ES (VIT) (N=25, sendo 12 com FP) e Florianópolis/SC (FLO) (3 animais sem FP) e em uma área mista: Fernando de Noronha/PE (FN) (26 não acometidas). Os congêneres foram extraídos de 1 mL de sangue usando hexano e diclorometano (1:1), a purificação envolveu duas etapas: (1) precipitação de proteínas com ácido sulfúrico e (2) micro colunas com alumina e diclorometano como eluente. Os extratos foram analisados com GC- $\mu$ ECD Agilent Technologies 7890A e a separação cromatográfica foi realizada em HP-5 (5% Fenil Metil Siloxano) coluna capilar (30 m x 0,320 mm i.d., espessura do filme 0,25  $\mu$ m). A atuação analítica foi baseada na *Commission Decision 2002/657/EC* por usar a abordagem de validação convencional. Devido aos problemas encontrados durante o processo analítico, o congênere PCB 52 foi eliminado das análises. Foi observada diferença significativa nas concentrações do congênere PCB 138 entre tartarugas com e sem FP capturadas em Vitória. Animais acometidos tiveram maiores concentrações de todas as PCBs quantificadas, exceto as tartarugas verdes capturadas em Vitória no caso dos congêneres PCBs 118, 138, 153 e 180. PCB 138 foi quantificado em maior concentração nas amostras e PCB 180 em níveis menores. Estes resultados demonstram que tais PCBs estão presentes no ecossistema marinho e as tartarugas verdes podem ser afetadas. Além disso, PCBs podem representar um papel na etiologia multifatorial da FP e influenciar na prevalência em deferentes áreas. A análise de PCBs em amostras sanguíneas fornece informações sobre uma possível relação entre estes compostos e a saúde das tartarugas marinhas, além de trazer conhecimentos para estabelecer planos de ação de conservação.

Palavras-chave: Tartarugas verdes; Fibropapilomatose; Poluentes ambientais; Bifenilas policloradas; Cromatografia gasosa

### Abstract

The green sea turtle (*Chelonia mydas*) can be found along of Brazilian coast, oceanic islands or atolls. The fibropapillomatosis (FP), disease characterized by benign skin tumors, is a significant threat to the conservation of *C. mydas* that has a multifactorial and complex



etiology involving the Chelonid Fibropapilloma-associated Herpesvirus, genetic and environmental factors. Polychlorinated biphenyls (PCBs) are considered immunosuppressive and carcinogenic environmental pollutants, thus, this study aimed to monitor seven congeners of PCBs (priorities by European legislation: PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) in blood samples from turtles with and without FP, using gas chromatographic with micro-cell electron capture detector (GC- $\mu$ ECD). Blood samples were collected from 80 specimens (59 non-affected and 21 with FP) caught in feeding areas: Ubatuba/SP (UBA) (n=14, of which 6 turtles with tumors), Almofala/CE (ALM) (n=12, of which 3 affected), Vitória/ES (VIT) (n=25, of which 12 with FP) and Florianópolis/SC (FLO) (3 turtles without tumors) and in one nesting and feeding area: Fernando de Noronha/PE (FN) (26 non-affected specimens). The PCBs were extracted from 1 mL of blood using hexane and dichloromethane (1:1), the clean-up involved two phases: (1) protein precipitation using sulfuric acid and (2) alumina column and dichloromethane as eluent. The extracts were analyzed with GC- $\mu$ ECD Agilent Technologies 7890A and the chromatographic separation was performed on a HP-5 (5% Phenyl Methyl Siloxane) capillary column (30 m x 0.320 mm i.d., 0.25  $\mu$ m film thickness). The analytical performance was based in a Commission Decision 2002/657/EC by using the conventional validation approach. Due problems found in the analytical process, the PCB 52 was eliminated of analysis. Was observed difference in PCB 138 concentrations between green sea turtle with and without FP caught in Vitória. Affected animals had higher concentrations of all PCBs quantified, except green sea turtles caught in Vitória in the event of PCBs 118, 138, 153 and 180. Were quantified highest concentrations of PCB 138 and lowest of PCB 180. These results demonstrate that PCBs are present in marine ecosystem and green sea turtles can be affected. Furthermore, PCBs can represent a role in the multifactorial etiology of FP and can affect its prevalence in different places. Analysis of PCBs in blood samples can provide information about the possible relation between these compounds and effects in health of sea turtles and brings knowledge skills in sea turtle conservation issues.

Keywords: Green sea turtles; Fibropapillomatosis; Environmental pollutants; Polychlorinated biphenyls; Gas chromatography

## 5.1 Introdução

A tartaruga verde (*Chelonia mydas*) possui distribuição circunglobal e é a espécie de tartaruga marinha que apresenta hábitos mais costeiros (HIRTH, 1997). Alimentam-se de algas e várias plantas aquáticas, mas podem também utilizar como recurso alimentar algumas águas-vivas, salpas e esponjas (SPOTILA, 2004).

As ameaças às tartarugas marinhas envolvem destruição de habitats; ação antrópica nas praias de nidificação (BUGONI et al., 2001), derrames de petróleo (WITHERINGTON, 2000) e outros tipos de poluição; atividades pesqueiras; alterações climáticas; desenvolvimento costeiro; patógenos e consumo e uso de carapaça, carne e ovos (MAST et al., 2005), além de doenças como a fibropapilomatose (MARCOVALDI et al., 2011).

A fibropapilomatose (FP) é caracterizada por tumores cutâneos benignos (ADNYANA et al., 1997), cuja causa está relacionada a um alfa-herpesvírus (ENE et al., 2005) e a fatores

associados como o desenvolvimento demográfico e as atividades industriais e agrônomicas (BALAZS, 1991; ADNYANA et al., 1997).

Quando as tartarugas verdes migram dos locais de alimentação oceânicos para as áreas costeiras, o hábito alimentar muda de onívoro à herbívoro. Nos ambientes costeiros (maior disponibilidade de alimento), há uma exposição dos animais a uma maior concentração de poluentes, que pode levar a um aumento da prevalência da doença (BAPTISTOTTE, 2007). Estudos têm sugerido que a causa da doença está dentro dos habitats de alimentação (CHALOUPKA; BALAZS; WORK, 2009), pois tem sido verificado que a fibropapilomatose (FP) não é evidente nesta espécie até que elas se desloquem do oceano aberto aos habitats de desenvolvimento neríticos ou costeiros (ENE et al., 2005).

Bifenilas policloradas (PCBs) são compostos lipofílicos, assim como muitos outros compostos orgânicos e, portanto, atravessam membranas celulares e associam-se aos lipídeos que as compõem (LANDRUM; FISHER, 1999 apud SOLLA, 2010). No sangue estes compostos associam-se às lipoproteínas (MATTHEWS et al., 1987 apud BOLL et al., 1998) e por isso este tecido pode ser considerado um bom indicativo de contaminação (van de Merwe et al., 2010).

No Brasil, mais da metade da população ocupa a faixa litorânea, onde é gerada parte da produção econômica, submetendo os ecossistemas costeiros a cargas poluidoras provenientes dos centros urbanos e de atividades industriais (MANGABEIRA, 2000). Em Ubatuba/SP, os baixos índices de coleta e tratamento de esgoto doméstico tornam estes efluentes a principal fonte de poluição hídrica da região (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2003, 2009). Em Almofala/CE a baixa densidade demográfica gera um menor volume de esgoto doméstico, mas a economia local é baseada na carcinicultura, atividade com potencial poluidor por metais como zinco e cobre (LACERDA et al., 2004). A região de Vitória/ES com elevada densidade populacional, pode lançar efluentes domésticos e industriais que resultam em poluição na área de alimentação de *C. mydas* entre a Ilha do Frade e o continente (SANTOS et al., 2011). Nestas três localidades são encontradas tartarugas verdes com e sem FP.

Devido ao caráter multifatorial da FP e de sua implicação para a conservação dos quelônios, o estudo desenvolvido teve como objetivo monitorar sete congêneres de PCBs em amostras sanguíneas de tartarugas verdes capturadas em quatro áreas de alimentação (costeiras) e em uma área mista (ilha).

PCBs foram os compostos selecionados porque são considerados promotores de tumores (YLITALO et al., 2005) e imunossupressores, sendo classificados como Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs).

## 5.2 Desenvolvimento

### 5.2.1 Tartarugas verdes estudadas e procedência

Foram utilizadas amostras de tartarugas verdes capturadas em quatro áreas de alimentação: Florianópolis/SC (FLO), Ubatuba/SP (UBA), Vitória/ES (VIT) e Almofala/CE (ALM) e em uma área mista (alimentação e reprodução): Fernando de Noronha/PE (FN) (Figura 5.1).

Os métodos de captura empregados seguiram as atividades de monitoramento da equipe do Projeto TAMAR-ICMBio: cerco flutuante em FLO; encalhe, boiando, rede de emalhe e cerco flutuante em UBA; tarrafa em VIT; curral em ALM; mergulho e acompanhamento de desova em FN.



Figura 5.1 – Áreas de estudo. Mapa editado por Ralph E. T. Vanstreels

### 5.2.2 Dados biométricos e classificação dos fibropapilomas

Foram anotados os seguintes dados biométricos: comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), largura curvilínea da carapaça (LCC) e massa corpórea (MC).

Os dados de CCC e MC foram usados para calcular o índice de condição corporal (ICC), um importante indicador que pode ser usado como parte da rotina de avaliação do estado de saúde das tartarugas verdes (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2012a e 2013). O valor do ICC foi obtido a partir do cálculo:  $ICC = MC \text{ (kg)}/CCC^3$ .

Com relação aos fibropapilomas, foram anotados dados como ausência ou presença dos tumores visíveis, quantidade, tamanho e localização anatômica (Figura 5.2), de acordo com estudos realizados por Sánchez-Sarmiento et al. (2012b) adaptando o protocolo usado pelo Projeto TAMAR-ICMBio. Além disso, os fibropapilomas foram classificados de acordo com o tamanho, considerando as categorias de Work e Balazs (1999): A (<1cm), B ( $1\text{cm} \leq \text{FP} \leq 4\text{cm}$ ), C ( $4\text{cm} < \text{FP} \leq 10\text{cm}$ ) e D (>10cm).

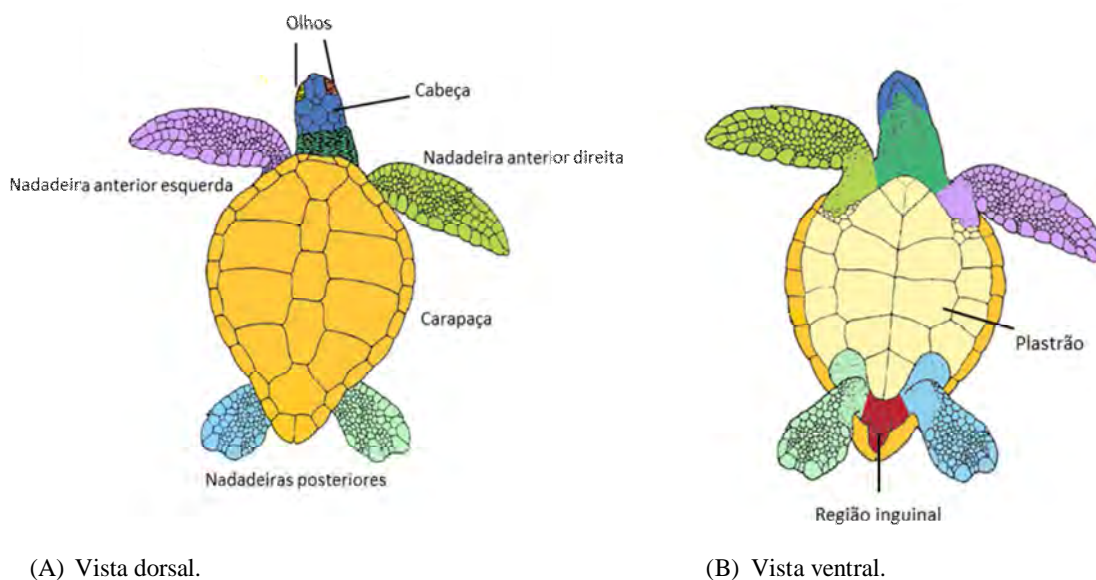


Figura 5.2 – Regiões anatômicas definidas para a análise dos fibropapilomas. Figuras adaptadas de Pritchard e Mortimer (2000) com edição de Silmara Rossi, Ralph E. T. Vanstreels e Angélica M. S. Sarmiento

### 5.2.3 Colheita das amostras sanguíneas

Para a obtenção das amostras sanguíneas foi necessária apenas contenção física das tartarugas.

A punção venosa foi realizada no seio venoso cervical, tendo o osso occipital como referência para sua localização (OWENS; RUIZ, 1980; SAMOUR et al., 1984; PAGE; MAUTINO, 1990; GOTTDENKER; JACOBSON, 1995).

O local da punção foi devidamente desinfetado com álcool iodado e o volume de sangue colhido, usando agulhas 30x7 mm e 40x1,20 mm (18G x 1 1/2"), variou entre 2 mL e 5 mL (Figura 5.3), considerando que os répteis suportam a colheita de um volume sanguíneo correspondente a 10% do volume total de sangue de seu corpo (MADER, 1996).



Figura 5.3 – Colheita de amostra sanguínea. Foto: Lilian Mourão

As amostras sanguíneas foram acondicionadas em tubos devidamente identificados contendo heparina sódica (Vacutainer<sup>®</sup>, Beckton-Dickinson, EUA) e congeladas em temperatura -18°C até o processamento das mesmas. A preparação das amostras para monitoramento de PCBs foi realizada no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP).

#### 5.2.4 Atividade celular

Algumas amostras sanguíneas obtidas das tartarugas verdes capturadas em UBA foram encaminhadas para análise da fagocitose e do *burst* oxidativo dos leucócitos. Estes resultados foram usados nas correlações com as concentrações de PCBs.

Um volume de 1 mL de sangue foi destinado para esta análise e foi transportado em meio de cultura RPMI1640 (Gibco<sup>®</sup>, LifeTechnologies<sup>™</sup>, EUA) (1:1).

Os leucócitos foram obtidos usando Percoll™ (GE-Healthcare Bio-Sciences, Suécia) de acordo com protocolo de Muñoz et al. (2009).

Em seguida as suspensões celulares, cujos leucócitos estavam viáveis, foram submetidas aos estímulos:

- 1) Zymosan A (*Saccharomyces cerevisiae* Bio Particles®, Alexa Fluor® 594 conjugate): para **avaliação da fagocitose**.
- 2) PMA (miristato-acetato de forbol) e PCB *mix solution* 6 (números 28, 52, 101, 138, 153 e 180) 10 ng/μL cada em isooctano OEKANAL® da Sigma-Aldrich-Fluka®: estímulos químicos para **avaliação do burst oxidativo**.

Todas as suspensões foram ajustadas a uma concentração de  $4 \times 10^5$  células/mL e houve a necessidade de amostras usadas como “controle” (sem estímulo).

A incubação das amostras foi realizada em temperatura ambiente por 50 minutos e a interrupção dos estímulos foi feita com EDTA 3 mM gelado.

A aquisição no citômetro ocorreu mediante os seguintes valores de calibração: 315 (SSC), 489 (FL1) e 566 (FL2) e *Threshold* ajustado para 617 (FSC), 52 (SSC, F11 e F12).

A aquisição e análise foi realizada em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems®, San José, CA, U.S.). Os dados coletados foram analisados pelo *software CellQuest Pro* (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

## 5.2.5 Etapas para a análise de bifenilas policloradas por cromatografia gasosa

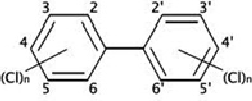
### 5.2.5.1 Cuidados analíticos

Todos os materiais utilizados durante os testes foram lavados com água corrente e detergente comum, três lavagens em água deionizada seguidas de três lavagens com n-hexano. Os materiais foram mantidos em temperatura ambiente até a completa secagem para sua utilização.

### 5.2.5.2 Soluções-padrão

Os compostos investigados foram os considerados prioritários pela legislação europeia (1992) (Quadro 5.1), cujos padrões foram adquiridos da AccuStandard®. O congênera

PCB153 é muito importante de ser monitorado por ser muito resistente ao metabolismo e altamente bioacumulado (LAKE et al., 1994).

Congêneres	Nomes segundo IUPAC	Fórmula estrutural geral
PCB 28	2,4,4' - triclorobifenil	
PCB 52	2,2',5,5' - tetraclorobifenil	
PCB 101	2,2',4,5,5' - pentaclorobifenil	
PCB 118	2,3',4,4',5 - pentaclorobifenil	
PCB 138	2,2',3,4,4',5' - hexaclorobifenil	
PCB 153	2,2',4,4',5,5' - hexaclorobifenil	
PCB 180	2,2',3,4,4',5,5' heptaclorobifenil	

Quadro 5.1 – Congêneres e nomes de acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

### 5.2.5.3 Validação do método

As concentrações usadas na curva analítica foram preparadas a partir dos padrões de cada congêneres monitorado e não de uma mistura. Inicialmente foram preparados os sete congêneres na concentração  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  usando o tolueno como dissolvente. Em seguida foi preparada a mistura contendo os sete congêneres monitorados. A primeira concentração preparada foi de  $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  e por diluição obteve-se  $0,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  (procedimento adotado para evitar possíveis erros durante a preparação).

As curvas analíticas no solvente e na matriz foram realizadas com 7 concentrações (7 pontos) denominadas de P1 a P7, tendo sido preparadas em triplicata (ANEXO).

A curva na matriz foi realizada com uma mistura de amostras sanguíneas obtidas de tartarugas verdes capturadas em Fernando de Noronha/PE. Esta decisão foi tomada por não existirem amostras certificadas da espécie estudada e por não se considerar conveniente utilizar amostras certificadas de outras espécies de animais. A região geográfica foi escolhida tendo como base o fato de não haver registro de FP nas tartarugas marinhas monitoradas desde 1984, ano que marcou o início das atividades na ilha pelo Projeto TAMAR-ICMBio.

A determinação das curvas analíticas (no solvente e na matriz) foi a primeira etapa da validação do método e optou-se considerar os tempos de retenção (Tabela 5.1) e os dados obtidos com os cálculos da curva na matriz. Esta escolha foi mais conveniente considerando a complexidade da matriz utilizada.

Com base nas análises da curva analítica e dos dados de recuperação, optou-se utilizar o limite de quantificação (LQ) prático que representa o primeiro ponto da curva analítica ( $0,0005 \mu\text{g mL}^{-1}$  ou  $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ).

Tabela 5.1 – Congêneres analisados e tempos de retenção obtidos no método

Congêneres	Curva no solvente	Curva na matriz
	Tempos de retenção (min)	
PCB 28	7,301	7,303
PCB 52	7,728	7,696
PCB 101	9,117	9,120
PCB 118	10,509	10,512
PCB 138	11,100	11,103
PCB 153	11,988	11,992
PCB 180	14,674	14,674

Através da análise da curva na matriz foram escolhidos dois pontos a serem usados nos cálculos da recuperação dos analitos, mais uma etapa essencial para a validação do método empregado. Foram escolhidos os pontos P2 e P5 correspondentes às concentrações  $0,002$  e  $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente, tendo sido realizadas sete repetições de cada uma.

O P7 que representa a maior concentração ( $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi utilizado na análise de repetitividade e reprodutividade. Foram utilizadas dez repetições para os cálculos finais.

#### 5.2.5.4 Extração

Antes de dar início ao processo de extração, as amostras sanguíneas ficaram em ultrassom por 20 minutos.

Os analitos foram extraídos de 1 mL de sangue total utilizando 5 mL de n-hexano:diclorometano (1:1) e agitação manual durante 5 minutos. Esta etapa foi repetida mais duas vezes e os sobrenadantes obtidos foram totalmente evaporados em fluxo de nitrogênio (TurboVap). Após a evaporação, foi adicionado 1 mL de n-hexano e breve passagem pelo ultrassom (alguns segundos por amostra).

#### 5.2.5.5 Purificação (*Clean-up*)

A purificação envolveu duas fases.



- 1) Precipitação de proteínas com ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ): o extrato final em n-hexano (1 mL) foi tratado com 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , seguido de agitação em Vortex<sup>®</sup> durante 1 minuto e centrifugação por 10 min, 3000 rpm, 18°C. A fase orgânica foi removida e separada para ser evaporada em fluxo de nitrogênio. Para a fase aquosa o procedimento descrito anteriormente foi repetido mais duas vezes com 1 mL de hexano (para “lavar” o ácido).
- 2) Micro-colunas contendo alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) e diclorometano como eluente: a quantidade de alumina utilizada correspondeu a uma altura de 3 cm da coluna. Antes da inclusão dos extratos, todas as colunas foram condicionadas por n-hexano. A eluição foi realizada com 5 mL do eluente (Figura 5.4).



Figura 5.4 – Micro-colunas contendo alumina para a segunda etapa do *clean-up*. Foto: Silmara Rossi

Os extratos obtidos foram coletados em frascos, nos quais foi adicionado sulfato de magnésio (quantidade referente a uma ponta de espátula), seguido de agitação manual e repouso durante 30 minutos. Esses extratos foram, então, filtrados e mantidos em fluxo de nitrogênio até a completa evaporação.

Após a evaporação, foi acrescentado 1 mL de tolueno e possíveis partículas interferentes foram removidas em filtros Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### 5.2.5.6 Análise cromatográfica

Os extratos foram analisados em um GC- $\mu\text{ECD}$  da *Agilent Technologies 7890A* equipado com um injetor automático *Agilent Technologies 7683 Series*. A injeção foi feita no modo *pulsed-split* utilizando 1  $\mu\text{L}$  de cada extrato uma única vez.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar HP-5 (5% Fenil Metil Siloxano) (30 m x 0,320 mm i.d., 0,25 µm de espessura do filme).

O programa de aquecimento empregado iniciou-se em 100°C, sendo 30°C/min até 150°C, seguido de 20°C/min até 240°C, depois 10°C/min até 280°C resultando em 18 minutos de corrida analítica. O gás de arraste usado foi o nitrogênio e foi adotado o limite de quantificação (LQ) prático (0,5 ng/mL).

A avaliação de desempenho analítico foi baseada em uma Decisão 2002/657/CE da Comissão das Comunidades Europeias, usando a abordagem de validação convencional.

#### 5.2.6 Análises estatísticas

Uma regressão logística nominal foi realizada para determinar a influência dos fatores do histórico individual sobre a ocorrência da fibropapilomatose. Para tal, foi definida como variável dependente a ocorrência de FP (ausência, presença) a ser analisada em função das seguintes variáveis independentes: (1) localidade (FLO, UBA, VIT, ALM e FN), (2) CCC (cm), (3) ICC e (4) o primeiro componente principal das concentrações de PCBs ( $PC_{PCB}$ ). O teste Qui-Quadrado da razão de verossimilhança (*Effect Likelihood Ratio Test*) foi utilizado para testar a significância do efeito de cada variável independente.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar o índice de fagocitose de leucócitos entre tartarugas com ou sem FP. A análise de regressão linear foi utilizada para avaliar a presença de correlação entre o índice de fagocitose de leucócitos e o componente principal das concentrações de PCBs. O nível de significância foi 0,05 para todos os testes.

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Anderson-Darling. Com relação aos dados biométricos, o CCC foi considerado não paramétrico e o ICC paramétrico. As concentrações de PCBs não apresentaram normalidade. Desta forma, utilizou-se o *2-Sample-t* para os dados paramétricos e os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para os não paramétricos.

A correlação entre as concentrações de PCBs ( $ng\ mL^{-1}$ ) foi avaliada por análise de regressão linear. Na presença de correlações significativas entre estas concentrações, foi feita uma análise de componentes principais, sendo selecionados apenas os componentes com *Eigenvalue* superior a 1 para análises subsequentes.

### 5.3 Resultados e Discussão

#### 5.3.1 Tartarugas verdes e áreas de captura

Foram obtidas amostras de 80 tartarugas verdes, sendo 59 sem FP e 21 acometidas (Tabela 5.2). A ocorrência da fibropapilomatose nas diferentes áreas de estudo foi variável, considerando que em duas localidades não foram capturadas tartarugas verdes acometidas (Tabela 5.3).

Tabela 5.2 – Número de tartarugas verdes, com e sem tumores, capturadas por área de coleta no período de ago/2010 a abr/2013

<b>Procedência</b>	<b>Número de <i>C. mydas</i> sem tumores</b>	<b>Número de <i>C. mydas</i> com tumores</b>	<b>Total</b>
Ubatuba/SP	8	6	14
Almofala/CE	9	3	12
Efluente final da Arcelor Mittal em Vitória/ES	13	12	25
Florianópolis/SC	3	-	3
Fernando de Noronha/PE	26	-	26
<b>Total</b>	<b>59</b>	<b>21</b>	<b>80</b>

As coletas em UBA foram realizadas no período de agosto/2010 a abril/2013, resultando em 13 viagens. Foram efetuadas duas viagens para ALM (janeiro de 2011 e julho de 2011). Em VIT a coleta foi realizada em setembro e outubro de 2011, em FLO em novembro de 2011 e em FN nos meses de março/2012 e maio/2013.

Tabela 5.3 - Ocorrência de fibropapilomatose em tartarugas verdes capturadas em diferentes localidades da costa brasileira

<b>Localidade</b>	<b>Fibropapilomatose</b>
Almofala/CE	25% (3/12)
Fernando de Noronha/RN	0% (0/26)
Vitória/ES	48% (12/25)
Ubatuba/SP	42,9% (6/14)
Florianópolis/SC	0% (0/3)
<b>Total</b>	<b>26,25% (21/80)</b>

Com relação ao método de captura, houve variação entre as áreas de estudo considerando as técnicas de monitoramento da equipe do Projeto TAMAR-ICMBio. A tabela 5.4 resume a distribuição do esforço amostral em função da localidade e da estratégia de captura.

Tabela 5.4 - Distribuição das tartarugas verdes amostradas em função da localidade e da estratégia de captura

Métodos de captura	Áreas de estudo					Total
	FLO	UBA	VIT	ALM	FN	
Encalhe espontâneo	-	1	-	-	-	1
Encontrado flutuando	-	6	-	-	-	6
Cerco flutuante	3	2	-	-	-	5
Curral	-	-	-	12	-	12
Rede de emalhe	-	3	-	-	-	3
Tarrafa	-	-	25	-	-	25
Captura em mergulho	-	-	-	-	25	25
Fêmea em desova	-	-	-	-	1	1
Não registrado	-	2	-	-	-	2
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>14</b>	<b>25</b>	<b>12</b>	<b>26</b>	<b>80</b>

Nota: FLO: Florianópolis/SC; UBA: Ubatuba/SP; VIT: Vitória/ES; ALM: Almofala/CE; FN: Fernando de Noronha/PE  
 -: Valor numérico nulo

A análise de regressão logística nominal (modelo completo:  $\chi^2 = 12,84$ ;  $df = 6$ ;  $P = 0,046$ ) revelou um efeito significativo da localidade ( $\chi^2 = 9,569$ ;  $df = 3$ ;  $P = 0,023$ ), CCC ( $\chi^2 = 4,250$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,039$ ) e ICC ( $\chi^2 = 3,916$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,048$ ) sobre a ocorrência da fibropapilomatose, ao contrário do primeiro componente principal ( $\chi^2 = 0,135$ ,  $df = 1$ ;  $P = 0,713$ ).

A Tabela 5.5 compara as razões de chance (RC) (*Odds Ratio*) e seus limites de intervalo de 95% de confiança (IC<sub>95%</sub>) de cada variável independente. Dentre as localidades, apenas três comparações apresentaram razões de chance significativamente diferentes de 1: ALM vs. VIT ( $P = 0,021$ ), FLO vs. UBA ( $P = 0,043$ ), FLO vs. VIT ( $P = 0,009$ ).

Tabela 5.5 - Razões de chance (por unidade) e seus limites de intervalo de 95% de confiança do efeito das variáveis quantitativas independentes sobre a ocorrência de fibropapilomatose

Variáveis independentes	Razões de chance [IC <sub>95%</sub> ]
Comprimento curvilíneo da carapaça (cm)	0,92 [0,84 – 0,99]
Índice de condição corporal	0,017 [0,0001 – 0,96]
Componente principal 1 (PC <sub>PCB</sub> )	0,99 [0,97 – 1]

### 5.3.2 Biometria e fibropapilomas

Todas as tartarugas estudadas eram juvenis, com exceção de uma fêmea adulta encontrada durante oviposição na Praia do Leão em FN.

Não foi possível obter a MC das tartarugas capturadas em FN e conseqüentemente os valores de ICC para estes animais.

Os animais capturados em FN apresentaram comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) mediano maior do que os das outras áreas de estudo ( $P=0$ ). Com relação ao ICC, as tartarugas com FP amostradas em UBA apresentaram maior valor mediano (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 - Comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) e índice de condição corporal (ICC) de acordo com a área de estudo

Áreas	Número de tartarugas	CCC mediano [Q1; Q3] (cm)	ICC mediano [Q1; Q3]	
Florianópolis	Sem FP	3	41,1 [37,5; 47,3]	1,23 [1,22; 1,28]
	Sem FP	8	32,9 [30; 37,1 ]	0,94 [0,72; 1,09]
Ubatuba	Com FP	6	45,9 [36,4; 58,9]	1,32 [1,1; 1,42]
	Sem FP	13	37 [35,6; 42]	1,07 [1; 1,13]
Vitória	Com FP	12	40,3 [37,6; 45,8]	1,03 [0,93; 1,12]
	Sem FP	9	40 [37,7; 47,2]	1,1 [0,98; 1,24]
Almofala	Com FP	3	44 [41,2; 64,7]	1,11*
	Sem FP	26	72 [65,8; 78,5]	...

Nota: \* Cálculo obtido de duas tartarugas

...: Dado não disponível

O CCC e o ICC não foram significativamente correlacionados ( $P = 0,320$ ,  $R^2 = 0,01\%$ ).

As Figuras 5.5 e 5.6 representam boxplots de CCC e ICC respectivamente das tartarugas verdes amostradas com e sem fibropapilomatose.

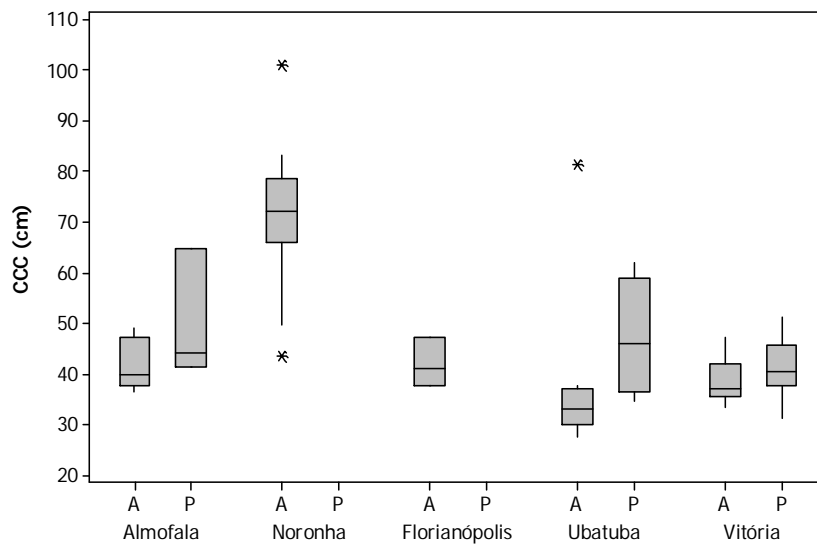


Figura 5.5 - Boxplot do Comprimento Curvilíneo de Carapaça (CCC) de tartarugas verdes amostradas, com e sem fibropapilomatose (FP), em diferentes localidades na costa brasileira (A: Ausência de FP; P: Presença de FP)

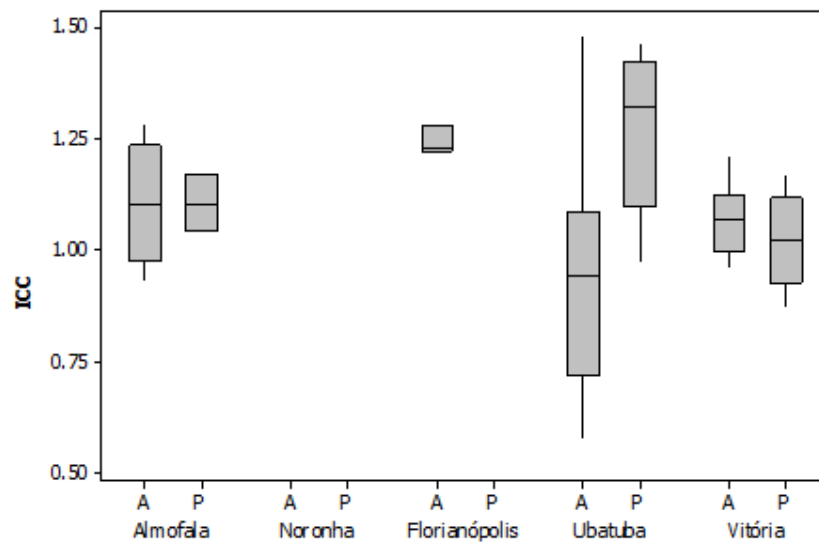


Figura 5.6 - Boxplot do Índice de Condição Corporal (ICC) de tartarugas verdes amostradas, com e sem fibropapilomatose (FP), em diferentes localidades na costa brasileira (A: Ausência de FP; P: Presença de FP)

### 5.3.3 Bifenilas policloradas

#### 5.3.3.1 Validação do método

Durante as análises dos cromatogramas foram observadas possíveis interferências no tempo de retenção correspondente ao congênere PCB 52. Não tendo obtido um resultado bem sucedido durante as tentativas de resolução para os problemas encontrados, optou-se por eliminar este congênere das análises.

A recuperação dos analitos foi considerada dentro dos valores indicados pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO (DOQ-CGCRE-008, Revisão 02 – JUNHO/2007) (Tabela 5.7).

Tabela 5.7 – Recuperação dos analitos considerando dois pontos da curva analítica (0,002 e 0,02  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

Congêneres	Recuperação (%) nas concentrações analisadas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )					
	Média		Desvio Padrão		Coeficiente de Variabilidade	
	0,002	0,02	0,002	0,02	0,002	0,02
PCB 28	108,99	108,8	13,17	1,96	12,08	1,8
PCB 101	119,93	95,45	31,9	16,89	26,59	17,69
PCB 118	115,15	119,88	24,89	1,23	21,62	1,03
PCB 138	100,65	117,47	21,5	2,24	21,36	1,9
PCB 153	113,96	94,07	14,35	1,59	12,59	1,7
PCB 180	121,73	119,58	7,19	0,72	5,91	0,61

#### 5.3.3.2 Análise das concentrações dos congêneres

Os congêneres analisados foram detectados e quantificados em todas as amostras sanguíneas, com exceção para o PCB 118 ausente em duas amostras de tartarugas sem FP capturadas em UBA e o PCB 180 ausente em duas amostras de animais provenientes de ALM e três de animais capturados em UBA (não acometidas). A tabela 5.8 contém as porcentagens que representam concentrações acima do LQ. SILVA (2009) detectou os 52 congêneres de PCBs monitorados em 27 provenientes de indivíduos da espécie *C. mydas* capturados em Ubatuba/SP. Foram analisadas amostras de fígado, rins, tecidos adiposo e muscular.

A concentração de PCBs, bem como de outros poluentes analisados, também foi quantificada em amostras sanguíneas e de tecido adiposo de tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*) capturadas na Carolina do Norte (EUA). Além disso, foram observadas correlações

significativas entre concentração dos poluentes e indicadores de fraqueza ou saúde alterada através da análise de parâmetros hematológicos, enzimáticos e iônicos (KELLER et al., 2004). Concentrações de PCBs também foram encontradas em amostras de fígado, tecido adiposo e músculo de espécimes de *C. caretta* capturados ao longo da costa norte do mar Adriático, entre Ravenna e Fano (CORSOLINI; AURIGI; FOCARDI, 2000).

Estudos de van de Merwe et al. (2010) encontraram correlações significativas entre concentração de PCBs no sangue e em tecidos como fígado, rins e tecido muscular. Estes resultados revelaram que as amostras sanguíneas podem ser consideradas um bom indicativo de contaminação química nestes outros tecidos, além de proporcionar a estimativa de POPs e metais pesados em animais vivos.

Tabela 5.8 – Porcentagem de amostras que tiveram concentrações acima do limite de quantificação

Áreas	PCB28		PCB101		PCB118		PCB138		PCB153		PCB180	
	AC	NAC	AC	NAC	AC	NAC	AC	NAC	AC	NAC	AC	NAC
<b>FLO</b>	-	67%	-	67%	-	100%	-	100%	-	100%	-	100%
<b>UBA</b>	100%	88%	50%	13%	100%	75%	100%	100%	100%	88%	100%	38%
<b>VIT</b>	100%	100%	100%	85%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>ALM</b>	100%	89%	67%	78%	100%	100%	100%	100%	100%	89%	67%	78%
<b>FN</b>	-	100%	-	69%	-	100%	-	100%	-	100%	-	96%

Nota: -: Valor numérico nulo

FLO: Florianópolis/SC; UBA: Ubatuba/SP; VIT: Vitória/ES; ALM: Almofala/CE; FN: Fernando de Noronha/PE

AC: acometida; NAC: não acometida

Os resultados quantificados foram analisados de acordo com a área de captura, considerando a ausência ou presença da FP. Não foram encontradas diferenças nas concentrações dos congêneres PCBs 28, 101, 118, 153 e 180 entre animais acometidos ou não de acordo com as áreas (Figuras 5.7 a 5.11). Entretanto, foi observada diferença nas concentrações do PCB 138 entre tartarugas com e sem FP capturadas em VIT (Figura 5.12).



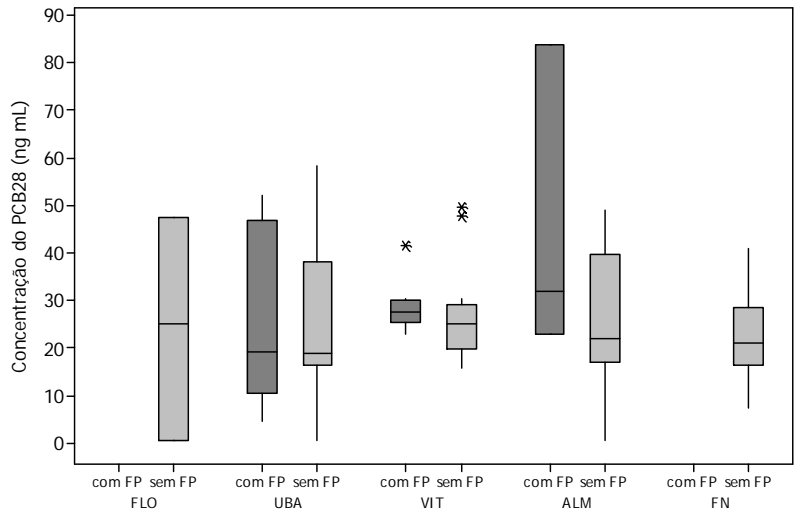


Figura 5.7 – Boxplot da concentração do PCB 28 nas amostras sanguíneas das tartarugas capturadas nas diferentes áreas de estudo

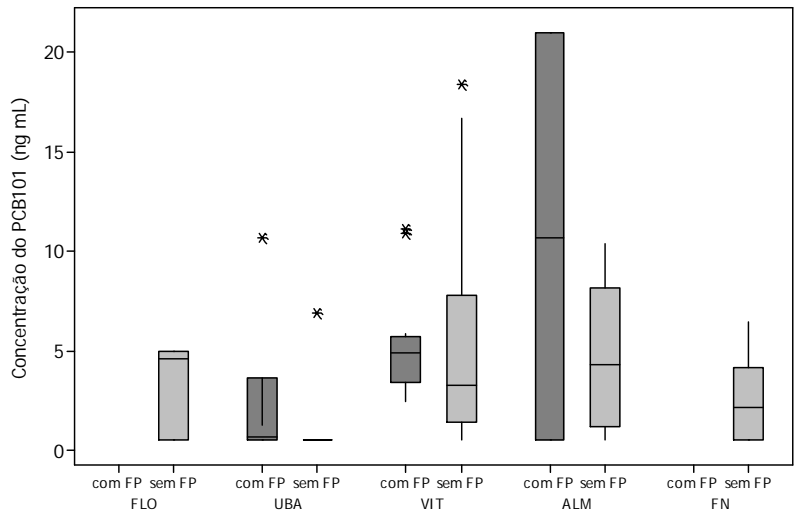


Figura 5.8 – Boxplot da concentração do PCB 101 nas amostras sanguíneas das tartarugas capturadas nas diferentes áreas de estudo

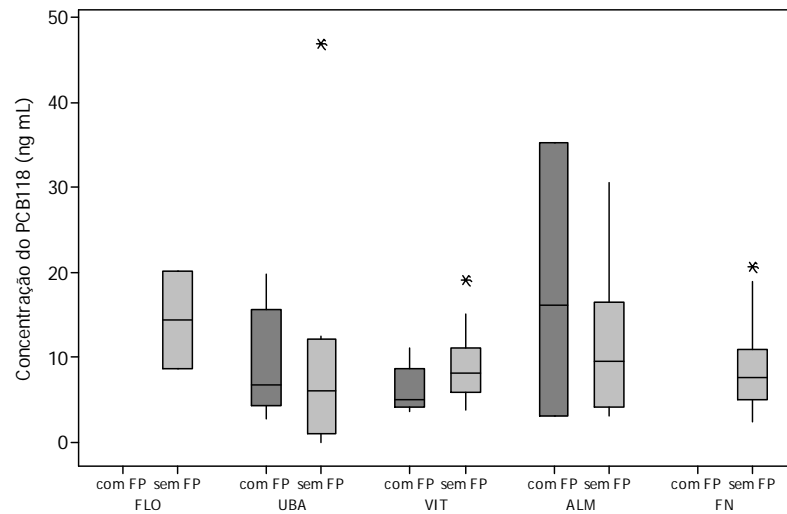


Figura 5.9 – Boxplot da concentração do PCB 118 nas amostras sanguíneas das tartarugas capturadas nas diferentes áreas de estudo

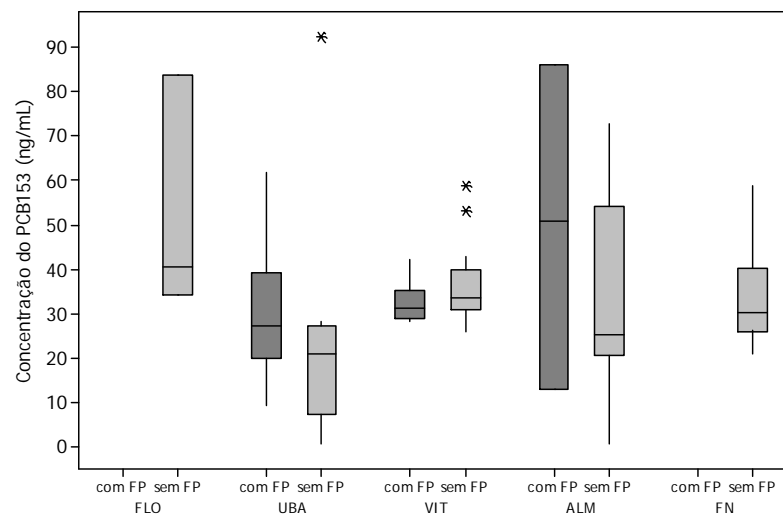


Figura 5.10 – Boxplot da concentração do PCB 153 nas amostras sanguíneas das tartarugas capturadas nas diferentes áreas de estudo

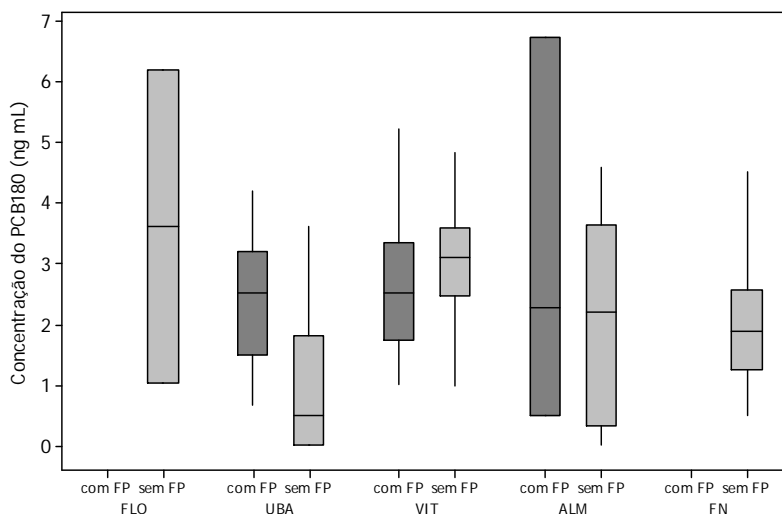


Figura 5.11 – Boxplot da concentração do PCB 180 nas amostras sanguíneas das tartarugas capturadas nas diferentes áreas de estudo

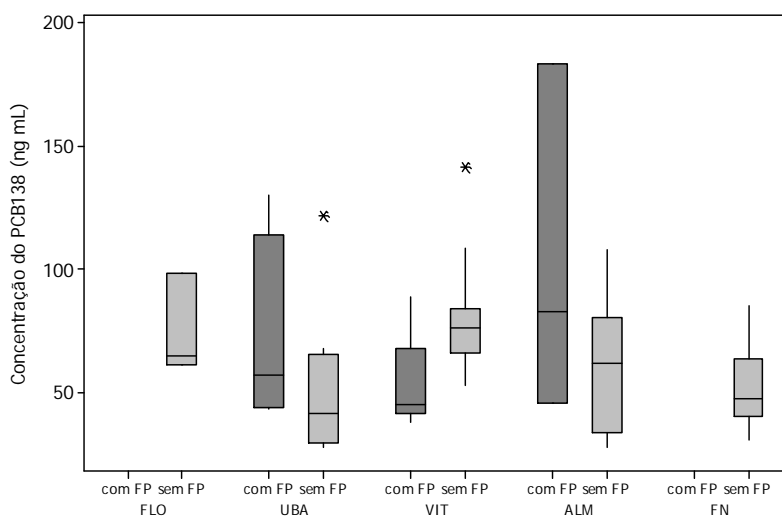


Figura 5.12 – Boxplot da concentração do PCB 138 nas amostras sanguíneas das tartarugas capturadas nas diferentes áreas de estudo

Animais acometidos tiveram maiores concentrações de todos os congêneres quantificados, com exceção para os PCBs 118, 138, 153 e 180 do caso dos animais capturados em VIT. O PCB 138 foi quantificado em maior concentração nas amostras de tartarugas verdes capturadas nas cinco regiões amostradas. Por outro lado, o congêneres quantificado em menor concentração foi o PCB 180. Os congêneres PCBs 138, 153 e 180 foram destacados por seus altos níveis em amostras de tecido adiposo e fígado nos estudos de Manzano (2007). PCBs 118, 138, 153, 180 e 195 foram as mais abundantes em amostras de fígado, músculo e

tecido adiposo de espécimes de *C. caretta* amostrados no mar Adriático. Os congêneres PCBs 138, 153 e 180 representaram 55% dos resíduos nos três tecidos analisados (CORSOLINI; AURIGI; FOCARDI, 2000). Análise de 52 congêneres de PCBs em amostras de fígado, rins, tecidos adiposo e muscular esquelético indicou que os predominantes foram os PCBs 44, 52, 99, 101, 118, 132, 138 e 153 (SILVA, 2009).

Amostras de fígado, rins, tecidos adiposo e muscular esquelético de espécimes de *C. mydas*, *L. olivacea* e *C. caretta* foram utilizadas para o monitoramento de diversos organoclorados (OCs), incluindo 20 congêneres de PCBs. Este estudo confirmou que a concentração da  $\Sigma$ OCs foi maior no tecido adiposo, seguida pelo fígado, rins e tecido muscular (GARDNER, 2003).

Estudos de Manzano (2007) revelaram que os congêneres mais destacados no fígado das tartarugas marinhas necropsiadas e amostradas corresponderam ao grupo dos hepta e hexaclorados junto com um representante de decaclorobifenila. Estes resultados também foram encontrados em estudos anteriores que analisaram amostras de fígado e tecido adiposo e verificaram o seguinte padrão de resultados: hexa > hepta > penta ~ octaclorados de (CORSOLINI; AURIGI; FOCARDI, 2000). Silva (2009) ao classificar os PCBs em leves (1 a 4 átomos de cloro – Cl), intermediários (5 Cl) e pesados (6 Cl a 10 Cl) verificou que os compostos leves e intermediários foram os predominantes nas amostras analisadas.

Silva (2009) ao comparar resultados de trabalhos realizados com diferentes espécies de tartarugas marinhas notou a seguinte tendência de concentração: *Lepidochelys olivacea* > *C. caretta* > *C. mydas* = *Dermochelys coriacea*. O monitoramento de organoclorados em fígado e tecido adiposo de tartarugas cabeçudas amostradas no Mediterrâneo e Atlântico revelou que estes indivíduos apresentaram altas concentrações de PCBs em todas as amostras mensuradas. Além disso, a concentração em tecido adiposo destes animais foi maior do que as encontradas em *C. mydas* capturadas no Mediterrâneo e *Dermochelys coriacea* capturadas na costa escocesa (MACKENZIE et al., 1999). Lake et al. (1994) ao analisar amostras de fígado de indivíduos juvenis da espécie *L. kempii* verificou que as concentrações de PCBs e p,p'-DDE foram maiores nesta espécie do que as encontradas em adultos de *C. caretta* e *C. mydas* encontradas ao longo da costa da Flórida nos estudos de McKim e Johnson (1983 apud LAKE, 1994).

Correlações significativas ocorreram entre as concentrações dos diferentes congêneres de PCBs, conforme demonstrado na Tabela 5.9 e na Figura 5.13. SILVA (2009) propôs que a semelhança na distribuição dos congêneres pode ocorrer como resultado da atividade metabólica das tartarugas marinhas.

Tabela 5.9 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre as concentrações de seis congêneres de PCBs em tartarugas-verdes estudadas

	PCB28	PCB101	PCB118	PCB138	PCB153
PCB101	0.489**	-	-	-	-
PCB118	0.507**	0.411**	-	-	-
PCB138	0.732**	0.605**	0.735**	-	-
PCB153	0.480**	0.548**	0.852**	0.725**	-
PCB180	0.292*	0.420**	0.279*	0.563**	0.506**

Nota: \* =  $P < 0.02$ ; \*\* =  $P < 0.001$

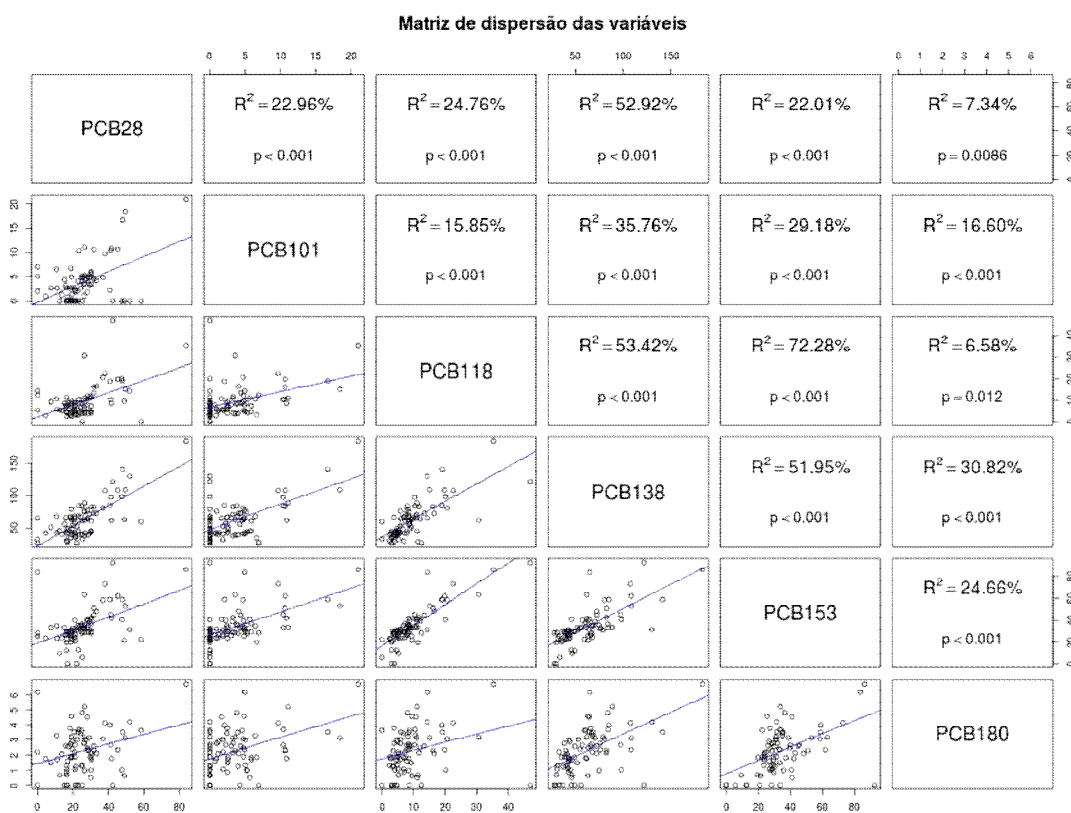


Figura 5.13 - Correlação entre as concentrações ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) de seis congêneres de PCBs nas tartarugas verdes estudadas

A análise de componentes principais revelou que as concentrações dos seis congêneres poderiam ser comprimidas em um único componente (PC1) capaz de explicar 62,8% das variáveis ( $Eigenvalue = 3,77$ ) e representou de forma equilibrada os seis congêneres de PCBs (coeficientes: PCB28 = 0,382, PCB101 = 0,373, PCB118 = 0,424, PCB138 = 0,478, PCB153 = 0,453, PCB180 = 0,319), enquanto os demais componentes explicavam entre 13,3% e 1,3% das variáveis ( $Eigenvalue$  de 0,799 a 0,080).

A figura 5.14 representa o boxplot das concentrações de PCBs quantificadas nas tartarugas verdes amostradas em diferentes localidades.

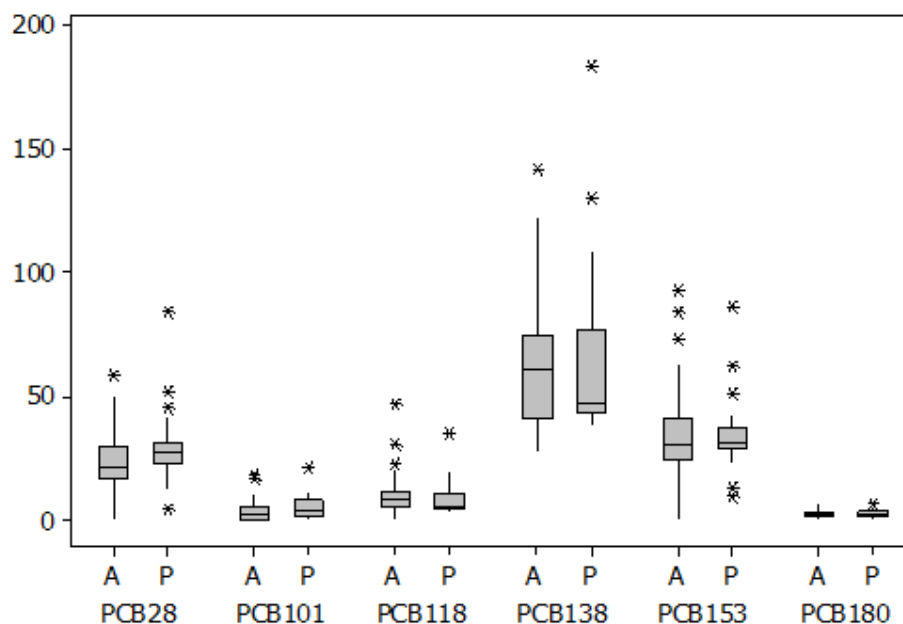


Figura 5.14 - Boxplot das concentrações de PCBs ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) em tartarugas verdes com ou sem fibropapilomatose (FP). A: Ausência de FP; P: Presença de FP

### 5.3.3.3 Correlações com a atividade celular

A atividade celular foi analisada de acordo com a média da intensidade de fluorescência (MIF). A diferença entre os grupos “controle” e “estimulado” resultou em um delta que foi utilizado na correlação com as concentrações de PCBs.

Devido aos problemas encontrados na manutenção da viabilidade celular, não foi possível analisar estatisticamente o *burst* oxidativo (número de amostras insuficiente), embora tenha sido observado aumento na MIF entre as amostras controle e com estímulo (PMA e PCB *mix solution*).

Tartarugas verdes com e sem FP não apresentaram diferenças significativas em relação ao delta da fagocitose de linfócitos ( $W = 9$ ,  $P = 0,233$ ), monócitos ( $W = 9$ ,  $P = 0,3768$ ) ou granulócitos ( $W = 14$ ,  $P = 0,596$ ) (Figura 5.15).

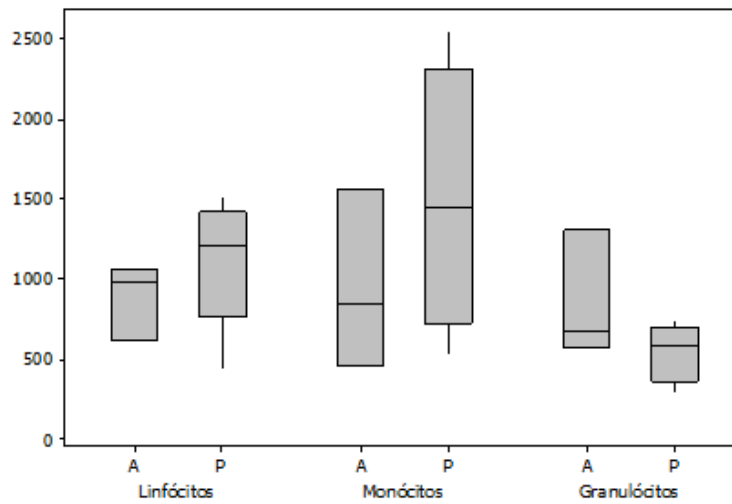


Figura 5.15 - Boxplot do delta da fagocitose dos leucócitos de tartarugas verdes com ou sem fibropapilomatose (FP). A: Ausência de FP; P: Presença de FP

O resultado obtido de poucas amostras possibilitou a realização das correlações entre concentração de PCBs e atividade celular dos leucócitos (Tabela 5.10).

Diantes destas análises não foi observada correlação significativa entre o componente principal das concentrações de PCBs ( $PC_{PCB}$ ) e o delta da fagocitose de linfócitos ( $P = 0,198$ ,  $R^2 = 0,135$ ), monócitos ( $P = 0,419$ ,  $R^2 < 0,001$ ) ou granulócitos ( $P = 0,714$ ,  $R^2 < 0,001$ ) (Figura 5.16).

Tabela 5.10 – Número de tartarugas verdes analisadas na correlação entre concentração de bifenilas policloradas e atividade celular dos leucócitos

Leucócitos	Número de tartarugas verdes analisadas	
	Sem FP	Com FP
Linfócitos	4	6
Monócitos	4	5
Granulócitos	4	5

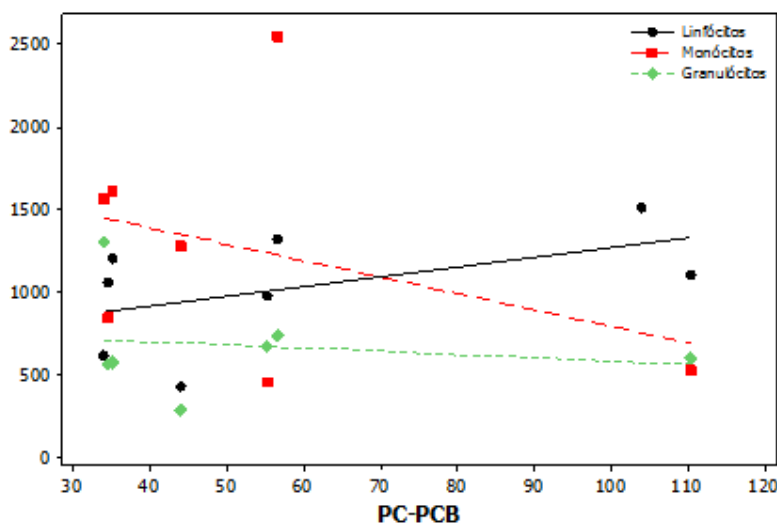


Figura 5.16 - Correlação entre o delta da fagocitose dos leucócitos de tartarugas verdes e o componente principal das concentrações de PCBs ( $PC_{PCB}$ )

Apesar de não ter havido uma correlação significativa, as análises indicaram que conforme aumentou o componente principal das concentrações de PCBs, aumentou também o delta da fagocitose dos linfócitos. Estudos de Keller e colaboradores (2006) ao testar a hipótese de que OCs podem estimular a proliferação de linfócitos (testes *in vitro*) de *C. caretta* demonstraram que estes compostos podem modular a função imune em tartarugas marinhas. Além disso, foi concluído que as tartarugas cabeçudas podem ser sensíveis aos efeitos imunomodulatórios dos OCs e que a proliferação linfocitária pode ser considerada como biomarcador da exposição de OCs.

#### 5.4 Conclusões

PCBs estão presentes no ecossistema marinho, sendo que a detecção destes compostos nas amostras sanguíneas das tartarugas verdes amostradas indica sua presença no organismo e evidencia uma bioacumulação nos tecidos adiposo e hepático destes animais. Desta forma, amostras sanguíneas podem indicar uma contaminação química, proporcionando a estimativa de PCBs em tartarugas verdes vivas.

Não foram encontradas diferenças significativas nas análises entre as áreas de estudo, fato esperado considerando os deslocamentos (entre áreas de alimentação e de reprodução) e



as longas migrações realizadas pelas tartarugas marinhas. Sendo assim, não foi possível estimar em que momento, com qual dose e poluente os animais estudados se contaminaram.

As análises entre atividade da fagocitose e o componente principal das concentrações de PCBs revelaram aumento do delta MIF dos linfócitos conforme houve aumento nas concentrações dos congêneres, apesar de não ter havido uma correlação significativa.

Estudos que visam estabelecer correlações entre poluentes químicos e doenças são extremamente importantes, pois contribuem para delinear planos de ação para conservação de espécies presentes da lista vermelha de fauna ameaçada como é o caso das tartarugas marinhas.

## Referências

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.

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

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

BOLL, M.; WEBER, L.W.D.B.; MESSNER, B.; STAMPFL, A. Polychlorinated biphenyls affect the activities of gluconeogenic and lipogenic enzymes in rat liver: is there an interference with regulatory hormone actions? **Xenobiotica**, London, v. 28, n. 5, p. 479-492, 1998

BUGONI, L.; KRAUSE, L.; PETRY, M.V. Marine debris and human impacts on sea turtles in southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 42, n. 12, p. 1330-1334, 2001.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório de balneabilidade das praias do estado – 2003**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/25-publicacoes/-relatorios>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

\_\_\_\_\_. **Relatório de balneabilidade das praias do estado – 2009**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/25-publicacoes/-relatorios>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

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.

CORSOLINI, S.; AURIGI, S.; FOCARDI, S. Presence of polychlorobiphenyls (PCBs) and coplanar congeners in the tissues of the Mediterranean loggerhead turtle (*Caretta caretta*). **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 40, n. 11, p. 952-960, 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.

HIRTH, H.F. **Synopsis of the biological data on green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758)**. Washington: U.S. Fish and Wildlife Service, 1997. 126 p.

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

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

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **MOD-SEGEQ-002**: orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2007. 25 p.

KELLER, J.M.; KUCKLICK, J.R.; STAMPER, A.; HARMS, C.A.; McCLELLAN-GREEN, P.D. Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, USA. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 112, n. 10, p. 1074-1079, July 2004.

KELLER, J.M.; McCLELLAN-GREEN, P.D.; KUCKLICK, J.R.; KEIL, D.E.; PEDEN-ADAM, M.M. Effects of organochlorine contaminants on loggerhead sea turtle immunity: comparison of a correlative field study and in vitro exposure experiments. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 114, n. 1, Jan. 2006.

LAKE, J.L.; HAEBLER, R.; MCKINNEY, R.; LAKE, C.A.; SADOVE, S.S. PCBs and other chlorinated organic contaminants in tissues of juvenile Kemp's ridley turtles (*Lepidochelys kempii*). **Marine Environmental Research**, Barking, v. 38, p. 313-327, 1994.

MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders, 1996. 1264 p.

MAKENZIE, C.; GODLEY, B.J.; FURNESS, R.W.; WELLS, D.E. Concentrations and patterns of organochlorine contaminants in marine turtles from Mediterranean and Atlantic waters. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 47, p. 117-135, 1999.

MANGABEIRA, F.C.C. **Monitoramento de áreas costeiras: aplicações para áreas tropicais.** 2000. 54 p. (Especialização em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais na Indústria) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2000.

MANZANO, P.M. **Detección de compuestos organoclorados en tortugas marinas varadas en las Islas Canarias y causas de mortalidad.** 2007. 257 p. Tese (Doctorado en Clínica Y Terapéutica) – Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, 2007.

MARCOVALDI, M.A.A.G.D.; SANTOS, A.S. dos; SALES, G. (Org.). *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758). In: \_\_\_\_\_. **Plano de Ação Nacional para Conservação das Tartarugas Marinhas.** Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011. pt. 1, p. 30-33. (Série Espécies Ameaçadas, 25).

MAST, R. B.; HUTCHINSON B. J.; HOWGATE E.; PILCHER N. J. MTSG update: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group hosts the second Burning Issues Assessment Workshop. **Marine Turtle Newsletter**, Exeter, v. 110, p. 13–15, 2005.

McKIM, J.M.; JOHNSON, K.L. Polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE in loggerhead and green postyearling Atlantic Sea turtles. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v. 31, p. 53-60, 1983.

MUÑOZ, F.A.; ESTRADA-PARRA, S.; ROMERO-ROJAS, A.; WORK, T.M., GONZALEZ-BALLESTEROS, E.; ESTRADA-GARCIA, I. Identification of CD3+ T lymphocytes in the green turtle *Chelonia mydas*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 131, n. 3/4, p. 211-217, 2009.

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

PAGE, C.D.; MAUTINO, M. Clinical management of tortoises. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton, v. 12, n. 2, p. 221-228, 1990.

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

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; ROSSI, S.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G.; BAPTISTOTTE, C.; BECKER, J.H.; LIMA, E.H.S.M.; MATUSHIMA, E.R. Distribución anatómica de fibropapilomas en tortugas verdes, *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae), capturadas en la costa brasileira. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE REABILITAÇÃO DE FAUNA MARINHA, 2., 2012, Rio Grande. **Resumos...** Rio Grande: CRAM-Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG-Aiuká, 2012a. p. 163.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; ROSSI, S.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G.; MARIGO, J.; BERTOZZI, C.P.; BAPTISTOTTE, C.; BECKER, J.H.; MATUSHIMA, E.R. Comparison between corporal subjective classification and body condition index (BCI) for *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) caught in Brazilian coast. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE REABILITAÇÃO DE FAUNA MARINHA, 2., 2012, Rio

Grande. **Resumos...** Rio Grande: CRAM-Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG-Aiuká, 2012b. p. 162.

SILVA, J. **Ocorrência de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em tartarugas marinhas *Chelonia mydas***. 2009. 57 p. Tese (Mestrado em Oceanografia Química e Geológica) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SOLLA, S.R. Organic contaminants in reptiles. In: SPARLING, D.W.; LINDER, G.; BISHOP, C.A.; KREST, S.K. (Ed.). **Ecotoxicology of amphibians and reptiles**. 2<sup>nd</sup> ed. SETAC, CRC Press - Taylor & Francis Group, [2010]. p. 289-324.

SPOTILA, J.R. **Sea turtles: a complete guide to their biology, behaviour and conservation**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press and Oakwood Arts, 2004. 227 p.

van de MERWE, J.P.; HODGE, M.; WHITTIER, J.M.; LEE, S.Y. Analysing persistent organic pollutants in eggs, blood and tissue of the green sea turtle (*Chelonia mydas*) using gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 393, p. 1719-1731, 2009.

van de MERWE, J.P.; HODGE, M.; OLSZOWY, H.A.; WHITTIER, J.M.; LEE, S.Y. Using blood samples to estimate persistent pollutants and metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*). **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 60, p. 579-588, 2010.

WITHERINGTON, B.E. Reducción de las amenazas al hábitat de anidación. In: ECKERT, K.L.; BJORDNAL, K.A.; ABREU-GROBOIS, F.A.; DONNELLY, M. (Ed.). **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas**. Tradução de R. Breseño-Dueñas e F.A. Abreu-Grobois. Washington: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group, 2000. p. 204-210 (Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación 4).

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, n. 4, p. 804-807, out 1999.

YLITALO, G.M.; STEIN, J.E.; HOM, T.; JOHNSON, L.L.; TILBURY, K.L.; HALL, A.J.; ROWLES, T.; GREIG, D.; LOWENSTINE, L.J.; GULLAND, F.M.D. The role of organochlorines in cancer-associated mortality in California sea lions (*Zalophus Californianus*). **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 50, p. 30-39, 2005.

## Anexo

Pontos da curva	Concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Volume ( $\mu\text{L}$ ) obtido da solução $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$	Volume ( $\mu\text{L}$ ) obtido da solução $5 \mu\text{g mL}^{-1}$
P1	0,0005	10	-
P2	0,002	40	-
P3	0,005	100	-
P4	0,01	200	-
P5	0,02	-	40
P6	0,05	-	100
P7	0,1	-	200

Quadro 5.1 - Concentração e volume de *PCB mix* utilizados para preparar os padrões destinados à curva analítica

## Apêndice

### SOLUÇÕES, REAGENTES E SOLVENTES

- *Phosphate-buffered saline* (PBS);
- Meio de cultura RPMI1640 (Gibco<sup>®</sup>, LifeTechnologies<sup>™</sup>, EUA)
- Azul de Tripán 0,4% (Sigma<sup>®</sup>);
- Miristato-acetato de forbol (PMA) (Calbiochem<sup>®</sup>);
- DCFH (2'7' diclorofluoriscéina) (Molecular Probes<sup>®</sup>);
- Zymosan A (*Saccharomyces cerevisiae*) BioParticles<sup>®</sup>, Alexa Fluor<sup>®</sup>594 conjugate;
- EDTA 3mM (Sigma<sup>®</sup>, USA);
- Percoll<sup>™</sup> (GE-Healthcare Bio-Sciences, Suécia)
- Solução de Hanks 1x e 10x (Gibco<sup>®</sup>, LifeTechnologies<sup>™</sup>, EUA);
- n-Hexano Análise Resíduo Pesticida, Vetec<sup>®</sup>;
- Tolueno UltimAR<sup>®</sup> Macron<sup>™</sup> Chemicals;
- Diclorometano HPLC/Spectro, Tedia Company, INC;
- Metanol HPLC/Spectro, Tedia Company, INC;
- Alumina (óxido de alumínio) Spectrum<sup>®</sup>;
- Sulfato de magnésio Sigma-Aldrich<sup>®</sup>;
- Congêneres PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180 e adquiridos da AccuStandard<sup>®</sup>.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabe-se que o sucesso reprodutivo de animais acometidos por neoplasias pode ser afetado pelo desenvolvimento da doença resultando em alteração na dinâmica populacional. Desta forma, a presença de neoplasias em espécies de animais selvagens pode tornar-se um obstáculo para sua conservação.

A fibropapilomatose, que comumente afeta a tartaruga verde, tem distribuição global e também já foi registrada nas outras espécies de tartarugas marinhas. Compreender os mecanismos biológicos desta afecção é extremamente importante para o estabelecimento de estratégias que visem a redução da sua prevalência, especialmente quando há o consenso de que a causa envolva também a ação antrópica.

As técnicas aplicadas permitiram a geração de dados sobre a saúde dos animais amostrados e, conseqüentemente, reforçam a necessidade dos planos de ação para a conservação desta espécie e do ecossistema.

As ferramentas científicas aplicadas neste estudo podem contribuir para o aumento do conhecimento sobre a doença e a elaboração de novas perspectivas para as questões relacionadas à Biologia e Medicina da Conservação.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*Comissão de Ética no uso de animais***CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da função celular de leucócitos por citometria de fluxo e a influência de poluentes químicos no desenvolvimento da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Cheloniidae)", protocolado sob o nº 1932/2010, utilizando número indeterminado de tartarugas verdes, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/05/2010.

We certify that the Research "Assessment of cellular function of leukocytes by flow cytometry and the influence of chemical pollutants in the development of fibropapillomatosis in *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Cheloniidae)", protocol number 1932/2010, under the responsibility Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/26/2010.

São Paulo, 27 de maio de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente



Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87  
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
São Paulo/SP – Brasil  
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757  
fone: + 55 11 3091-7671/7676  
E-mail: [fmvz@usp.br](mailto:fmvz@usp.br)  
<http://www.fmvz.usp.br>