ISABELA SANTOS SILVA

Detecção de *Chelonid alphaherpesvirus-5* (ChHV5) em sangue e órgãos de *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) e correlação com aspectos morfométricos em animais com e sem fibropapilomatose da costa de Ubatuba/São Paulo

São Paulo
2019

ISABELA SANTOS SILVA

Detecção de *Chelonid alphaherpesvirus-5* (ChHV5) em sangue e órgãos de *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) e correlação com aspectos morfométricos em animais com e sem fibropapilomatose da costa de Ubatuba/São Paulo

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

Departamento:
Departamento de Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima

São Paulo
2019

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3826
FMVZ

Silva, Isabela Santos
Detecção de *Chelonid alphaherpesvirus-5* (ChHV5) em sangue e órgãos de *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) e correlação com aspectos morfométricos em animais com e sem fibropapilomatose da costa de Ubatuba/São Paulo / Isabela Santos Silva. – 2019.
117 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima.

1. Tumores. 2. Patogenia.3. Tartarugas-marinhas. 4. Conservação. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Detecção de ChHV-5 em sangue e órgãos de Chelonia mydas e correlação com aspectos morfométricos em animais com e sem fibropapilomas no litoral paulista.", protocolada sob o CEUA nº 7501060717 (ID 005034), sob a responsabilidade de **Eliana Reiko Matushima** *e equipe; Isabela Santos Silva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 20/06/2018.

We certify that the proposal "Detection of ChHV-5 in blood and organs of Chelonia mydas and correlation with morphometrics in animals with and without fibropapillomas in the coast of São Paulo", utilizing 50 Reptiles (males and females), protocol number CEUA 7501060717 (ID 005034), under the responsibility of **Eliana Reiko Matushima** *and team; Isabela Santos Silva* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/20/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 08/2017 a 07/2019 Área: Patologia Experimental E Comparada

Origem:	Não aplicável biotério						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 100 anos	N:	50
Linhagem:	Chelonia mydas			Peso:	0 a 200 kg		

Local do experimento: Laboratório de Patologia Comparada (LAPCOM) do Departamento de Patologia da Faculdade de Vedicina Veterinária e Zootecnia.

São Paulo, 19 de julho de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32636-7	Data da Emissão: 15/07/2016 16:52	Data para Revalidação*: 14/08/2017

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: FABIOLA ELOISA SETIM PRIOSTE	CPF: 179.214.168-88
Título do Projeto: PRESENÇA DE METAIS PESADOS EM SANGUE E TECIDOS DE TARTARUGA VERDE (CHELONIA MYDAS) COM E SEM FIBROPAPILOMATOSE EM QUATRO LOCALIDADES DO LITORAL BRASILEIRO	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	colheita de material biológico em Fernando de Noronha	06/2012	05/2014
2	colheita de material biológico	07/2016	07/2020

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Solicito que a pesquisadora encaminhe ao Centro TAMAR-ICMBio cópia digital das publicações resultantes da pesquisa.
2	O pesquisador deverá encaminhar ao ICMBio em Fernando de Noronha cópia digital das publicações resultantes do estudo.
3	O pesquisador deverá encaminhar ao ICMBio em Fernando de Noronha (pesquisaparnamarfn@gmail.com) cópia digital das publicações resultantes do estudo.
4	A chefia da Unidade deverá ser informada tão logo quanto possível sobre qualquer anormalidade eventualmente verificada durante os trabalhos de campo. Não fica autorizado o abate de animais. As necrópsias devem ser realizadas nas dependências do TAMAR.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Eliana Reiko Matushima	orientadora	074.600.228-96	6.578.222 SSP/SP-SP	Brasileira
2	Silmara Rossi	pesquisador	257.342.368-96	266048080 SSP-SP	Brasileira
3	Marco Aurélio Gattamorta	pesquisador	258.904.238-86	27528532-7 SSP-SP-SP	Brasileira
4	Isabela Santos Silva	pesquisadora	391.885.398-57	472237962 SSP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 13215673

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32636-7	Data da Emissão: 15/07/2016 16:52	Data para Revalidação*: 14/08/2017

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: FABIOLA ELOISA SETIM PRIOSTE	CPF: 179.214.168-88
Título do Projeto: PRESENÇA DE METAIS PESADOS EM SANGUE E TECIDOS DE TARTARUGA VERDE (CHELONIA MYDAS) COM E SEM FIBROPAPILOMATOSE EM QUATRO LOCALIDADES DO LITORAL BRASILEIRO	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

5	Roberta Ramblas Zamana	pesquisadora	368.330.528-24	363670737 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Municipio	UF	Descrição do local	Tipo
1		CE	Almofala	Fora de UC Federal
2		ES	Vitória	Fora de UC Federal
3		SP	Ubatuba	Fora de UC Federal
4		PE	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DE FERNANDO DE NORONHA - ROCAS - SÃO PEDRO E SÃO PAULO	UC Federal
5		PE	PARQUE NACIONAL MARINHO DE FERNANDO DE NORONHA	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Chelonia mydas
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chelonia mydas

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Tartarugas marinhas)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ovos, Regurgitação/conteúdo estomacal
2	Método de captura/coleta (Tartarugas marinhas)	Outros métodos de captura/coleta(captura intencional por mergulho e incidental em rede de pesca)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 13215673

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32636-7	Data da Emissão: 15/07/2016 16:52	Data para Revalidação*: 14/08/2017

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: FABIOLA ELOISA SETIM PRIOSTE	CPF: 179.214.168-88
Título do Projeto: PRESENÇA DE METAIS PESADOS EM SANGUE E TECIDOS DE TARTARUGA VERDE (CHELONIA MYDAS) COM E SEM FIBROPAPILOMATOSE EM QUATRO LOCALIDADES DO LITORAL BRASILEIRO	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 13215673

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32636-7	Data da Emissão: 15/07/2016 16:52	Data para Revalidação*: 14/08/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: FABIOLA ELOISA SETIM PRIOSTE	CPF: 179.214.168-88
Título do Projeto: PRESENÇA DE METAIS PESADOS EM SANGUE E TECIDOS DE TARTARUGA VERDE (CHELONIA MYDAS) COM E SEM FIBROPAPILOMATOSE EM QUATRO LOCALIDADES DO LITORAL BRASILEIRO	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 13215673

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32636-9	Data da Emissão: 02/01/2018 09:00	Data para Revalidação*: 01/02/2019

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: FABIOLA ELOISA SETIM PRIOSTE	CPF: 179.214.168-88
Título do Projeto: Estudo do estado sanitário de tartarugas-marinhas encontradas/capturadas no litoral brasileiro	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	colheita de material biológico em Fernando de Noronha	10/2017	05/2020
2	colheita de material biológico	10/2017	07/2020

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	O pesquisador titular desta autorização deverá enviar para o Centro TAMAR-ICMBio, ao final do desenvolvimento do projeto, cópia integral dos relatórios e publicações científicas oriundos da pesquisa em questão.
2	O pesquisador responsável deverá fornecer ao ICMBio-FN cronograma de atividades de campo antes do início do trabalho na UC. O acesso a áreas fechadas à visitação deverá constar em cronograma e será acompanhado por técnico designado pela chefia da UC. O pesquisador deverá enviar ao ICMBio-FN cópia digital das publicações resultantes do estudo, através do e-mail pesquisaparnamarfn@gmail.com.
3	O pesquisador responsável deverá fornecer ao ICMBio-FN cronograma de atividades de campo antes do início do trabalho na UC. O acesso a áreas fechadas à visitação deverá constar em cronograma e será acompanhado por técnico designado pela chefia da UC. O pesquisador deverá enviar ao ICMBio-FN cópia digital das publicações resultantes do estudo, através do e-mail pesquisaparnamarfn@gmail.com.
4	Para o Refugio de Vida Silvestre do Arquipélago de Alcatrazes, todas as atidades de campo deverão ser acompanhadas por um servidor da unidade.
5	A chefia da Unidade deverá ser informada tão logo quanto possível sobre qualquer anormalidade eventualmente verificada durante os trabalhos de campo. Não fica autorizado o abate de animais. As necrópsias devem ser realizadas nas dependências do TAMAR.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n° 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 47132192

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32636-9	Data da Emissão: 02/01/2018 09:00	Data para Revalidação*: 01/02/2019

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: FABIOLA ELOISA SETIM PRIOSTE	CPF: 179.214.168-88
Título do Projeto: Estudo do estado sanitário de tartarugas-marinhas encontradas/capturadas no litoral brasileiro	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

1	Eliana Reiko Matushima	orientadora	074.600.228-96	6.578.222 SSP/SP-SP	Brasileira
2	Marco Aurélio Gattamorta	pesquisador	258.904.238-86	27528532-7 SSP-SP-SP	Brasileira
3	Isabela Santos Silva	pesquisadora	391.885.398-57	472237962 SSP-SP	Brasileira
4	Roberta Ramblas Zamana	pesquisadora	368.330.528-24	363670737 SSP-SP	Brasileira
5	andressa sales garcia	pesquisadora	456.153.088-69	525954442 ssp-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		CE	Almofala	Fora de UC Federal
2		ES	Vitória	Fora de UC Federal
3		SP	Ubatuba	Fora de UC Federal
4		PE	AREA DE PROTEÇAO AMBIENTAL DE FERNANDO DE NORONHA - ROCAS - SÃO PEDRO E SÃO PAULO	UC Federal
5		PE	PARQUE NACIONAL MARINHO DE FERNANDO DE NORONHA	UC Federal
6		SP	REFUGIO DE VIDA SILVESTRE DO ARQUIPÉLAGO DE ALCATRAZES	UC Federal
7		RN	Natal	Fora de UC Federal
8		SP	ESTAÇÃO ECOLÓGICA TUPINAMBÁS	UC Federal
9		SP	São Sebastião	Fora de UC Federal
10		ES	RESERVA BIOLÓGICA DE COMBOIOS	UC Federal
11		RN	Pólo Costa Branca	Fora de UC Federal
12		ES	Anchieta	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Dermochelys coriacea, Eretmochelys imbricata, Chelonia mydas, Caretta caretta, Lepidochelys olivacea
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Dermochelys coriacea, Lepidochelys olivacea, Caretta caretta, Chelonia mydas, Eretmochelys imbricata

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Tartarugas marinhas)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Regurgitação/conteúdo estomacal
2	Método de captura/coleta (Tartarugas marinhas)	Outros métodos de captura/coleta(captura intencional por mergulho e incidental em rede de pesca)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 47132192

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32636-9	Data da Emissão: 02/01/2018 09:00	Data para Revalidação*: 01/02/2019

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: FABIOLA ELOISA SETIM PRIOSTE	CPF: 179.214.168-88
Título do Projeto: Estudo do estado sanitário de tartarugas-marinhas encontradas/capturadas no litoral brasileiro	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 47132192

Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32636-10	Data da Emissão: 25/03/2019 22:32:25	Data da Revalidação*: 25/03/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

SISBIO

Nome: FABIOLA ELOISA SETIM PRIOSTE	CPF: 179.214.168-88

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	colheita de material biológico	10/2017	07/2020
2	colheita de material biológico em Fernando de Noronha	10/2017	05/2020

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Eliana Reiko Matushima	orientadora	074.600.228-96	Brasileira
2	Marco Aurélio Gattamorta	pesquisador	258.904.238-86	Brasileira
3	Roberta Ramblas Zamana	pesquisadora	368.330.528-24	Brasileira
4	Isabela Santos Silva	pesquisadora	391.885.398-57	Brasileira

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
3	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
4	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
5	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
6	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nÂº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0326361020190325

Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32636-10	Data da Emissão: 25/03/2019 22:32:25	Data da Revalidação*: 25/03/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

SISBIO

Nome: FABIOLA ELOISA SETIM PRIOSTE	CPF: 179.214.168-88

Observações e ressalvas

8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/ogen.

Outras ressalvas

1	A chefia da Unidade deverá ser informada tão logo quanto possível sobre qualquer anormalidade eventualmente verificada durante os trabalhos de campo. Não fica autorizado o abate de animais. As necrópsias devem ser realizadas nas dependências do TAMAR.	CR 6 Cabedelo-PB
2	O pesquisador responsável deverá fornecer ao ICMBio-FN cronograma de atividades de campo antes do início do trabalho na UC. O acesso a áreas fechadas à visitação deverá constar em cronograma e será acompanhado por técnico designado pela chefia da UC. O pesquisador deverá enviar ao ICMBio-FN cópia digital das publicações resultantes do estudo, através do e-mail pesquisaparnamarfn@gmail.com.	APA Fernando de Noronha
3	O pesquisador titular desta autorização deverá enviar para o Centro TAMAR-ICMBio, ao final do desenvolvimento do projeto, cópia integral dos relatórios e publicações científicas oriundos da pesquisa em questão.	TAMAR Vitória/ES
4	Para o Refugio de Vida Silvestre do Arquipélago de Alcatrazes, todas as atidades de campo deverão ser acompanhadas por um servidor da unidade.	REVIS Arquipélago de Alcatrazes

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Ubatuba	SP	Marinho	Não	Fora de UC Federal
2	Almofala	CE	Marinho	Não	Fora de UC Federal
3	Vitória	ES	Marinho	Não	Fora de UC Federal
4	São Sebastião	SP	Marinho	Não	Fora de UC Federal
5	Pólo Costa Branca	RN	Marinho	Não	Fora de UC Federal
6	Natal	RN	Marinho	Não	Fora de UC Federal
7	Anchieta	ES	Marinho	Não	Fora de UC Federal
8	Área de Proteção Ambiental de Fernando de Noronha - Rocas - São Pedro e São Paulo	PE	Marinho	Não	Dentro de UC Federal
9	Parque Nacional Marinho de Fernando de Noronha	PE	Marinho	Não	Dentro de UC Federal
10	Refúgio de Vida Silvestre do Arquipélago de Alcatrazes	SP	Marinho	Não	Dentro de UC Federal
11	Estação Ecológica de Tupinambás	SP	Marinho	Não	Dentro de UC Federal
12	Reserva Biológica de Comboios	ES	Marinho	Não	Dentro de UC Federal

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nÂº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0326361020190325

Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32636-10	Data da Emissão: 25/03/2019 22:32:25	Data da Revalidação*: 25/03/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

SISBIO

Nome: FABIOLA ELOISA SETIM PRIOSTE	CPF: 179.214.168-88

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Caretta caretta	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Caretta caretta	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chelonia mydas	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Chelonia mydas	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Dermochelys coriacea	-
6	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Dermochelys coriacea	-
7	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Eretmochelys imbricata	-
8	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Eretmochelys imbricata	-
9	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Lepidochelys olivacea	-
10	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Lepidochelys olivacea	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Tartarugas marinhas)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão, Ovos, Regurgitação/conteúdo estomacal, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele
2	Método de captura/coleta (Tartarugas marinhas)	Outros métodos de captura/coleta(captura intencional por mergulho e incidental em rede de pesca)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE DE SAO PAULO	Outro

Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32636-10	Data da Emissão: 25/03/2019 22:32:25	Data da Revalidação*: 25/03/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

SISBIO

Nome: FABIOLA ELOISA SETIM PRIOSTE	CPF: 179.214.168-88

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nÂº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0326361020190325

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Isabela Santos

Título: **Detecção de *Chelonid alphaherpesvirus-5* (ChHV5) em sangue e órgãos de *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) e correlação com aspectos morfométricos em animais com e sem fibropapilomatose da costa de Ubatuba/São Paulo**

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

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Julgamento:_____

Dedico esse trabalho

Aos meus amados pais, Josefa Maria e Severino Monteiro,

que não tiveram a oportunidade de estudar tanto quanto gostariam, mas sempre prezaram pela minha educação e pela educação da minha irmã, Laura.

Se não fosse o apoio e o incentivo de vocês dois, eu com certeza não chegaria até aqui.

Pai, onde estiver, espero que esteja orgulhoso.

Mãe, por toda sua luta pra nos criar e nos ajudar a alcançar nossos sonhos,

Muito obrigada!

Agradecimentos

Primeiro, gostaria de agradecer imensamente a Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, minha orientadora. Matu, nunca esquecerei como fui bem recebida por você, desde aquele primeiro e-mail. Muito obrigada pelo voto de confiança, pela paciência, por todos os ensinamentos e conselhos. Tenho muita admiração por seu trabalho e pelo o que você defende! Você é um exemplo de mulher que venceu nesse ambiente tão complexo que é o meio acadêmico.

Ao querido Marco Aurélio Gattamorta, você foi indispensável em toda a elaboração e execução desse trabalho. Muito obrigada pela paciência e por todo o apoio e suporte científico e emocional. Ma, você é um exemplo de pessoa e de profissional e foi um imenso prazer e privilégio ter você como colega de trabalho.

Roberta Ramblas Zamana, por toda ajuda e pela companhia. Você me recebeu, me apoiou e me ensinou tudo desde o primeiro dia que pisei no laboratório. Rosita, você foi outra pessoa imprescindível para a realização deste trabalho. Muito obrigada por todos os conselhos, pela amizade e pelos momentos de descontração e diversão. Você é maravilhosa em diversos sentidos. Sou grata por ter te conhecido!

Aos meus queridos colegas do Grupo de Pesquisa sobre Fibropapilomatose em Tartarugas Marinha: Silmara Rossi, pesquisadora fantástica, mulher incrível. Mara, muito obrigada por toda sua ajuda, conselhos, companhia, por me receber na sua linda casinha e me permitir conhecer o Rio Grande do Norte. Fabíola Priostes, profissional excepcional, mulher de muita garra. Fa, você tem uma luz especial e tem a capacidade de levar alegria para onde vai. Muito obrigada por todo apoio e carinho! Gabriela Coleta, menina gentil e dedicada que tanto me ajudou no projeto e foi uma grande companheira e amiga. Obrigada Gabi, você é outro presente que as tartarugas me proporcionaram! Daniel Nakamura, outro querido que sempre se mostrou disposto a me ajudar, tanto me apoiou e me agraciou com a ilustração da capa deste trabalho. Muito obrigada Dani, você transformou minha ideia em uma linda imagem!

Agradeço muito ao Projeto TAMAR Ubatuba/SP por todo o apoio logístico e suporte nas coletas e em campo, especialmente aos funcionários que me ajudaram diretamente: Daniela Costa, Rodrigo Vanucci, Vinícius Oliveira, Lucas Rodrigues, Mauro Corrêa, Fabiano Oliveira, Andrei Santo, Henrique Becker, Lívia Segantin, Fernando Alvarenga e a todos os estagiários tão fundamentais para essa organização.

Ao ICMBio Alcatrazes/SP e em especial à Dra. Silvia Godoy, pelo fornecimento das amostras e por sua disponibilidade durante as coletas e pelas risadas que sempre fornece nos nossos encontros.

Quero agradecer também meus colegas do LAPCOM: Pablo Cruz-Ochoa, Sândara Sguario, Josué Diaz, Katia Groch, Cínthia Favero, Juliana Marigo, Danny Castillo, Angelica Sarmiento, Camila Molina, Carolina Ewbank, Carlos Sacristán, Marcelo Carvalho. Obrigada pelos bons momentos de convivência e por toda ajuda nos momentos de dúvida. Agradeço especialmente a Jorge Oyakawa e Pedro Navas-Suárez que sempre me trataram com muito carinho, por toda ajuda, pelas conversas estimulantes, companhia, preocupação e por tornarem mais leve a rotina de experimentos.

Aos queridos Mauro e Edson, funcionários do VPT que sempre foram tão atenciosos e carinhosos comigo!

Ao meu Professor do Ensino Médio, que me incentivou e mostrou que o mundo das universidades públicas era possível a nós, alunos da Rede Pública. Mário Oliveira, muito obrigada! E a todos meus outros Professores e Professoras que tanto se esforçaram para que o ensino fosse tão bom quanto deveria ser, apesar das condições não favoráveis. Muito obrigada!

Existe um trecho da crônica "Meus secretos amigos" de Paulo Sant'Ana que diz “Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!”. Eu não poderia concordar mais com uma frase, por isso eu tenho que agradecer:

Aqueles, que tive o prazer de conhecer e conviver no Departamento de Patologia e que se tornaram amigos de grande valor: Mariana Aranha, Marina Landi, Laís Rodrigues, Alessandra

Loureiro, Ticiana Brasil, Frederico Vaz, Gislaine Dalazen, e Vivian Rispoli. Muito obrigada por toda amizade, carinho, companhia e ajuda das mais diversas formas, vocês fizeram essa jornada muito valiosa e cheia de boas memórias! Não tenho palavras para explicar quanto o apoio de vocês foi imprescindível para que eu chegasse ao fim dessa jornada!

Aos meus grandes amigos, anjos que a vida me deu, que tanto me apoiaram, aconselharam, ouviram, e ajudaram direta e indiretamente para a conclusão desse trabalho: Ca, minha maninha, obrigada por estar sempre disposta a me ajudar e alegrar. Os momentos com você são sempre únicos e memoráveis; Nanda, sempre companheira e carinhosa. Que alegria poder chamar você de amiga e poder contar com seu colo (literalmente) e seus cuidados; Leles, minha fonte de sorrisos! Obrigada por não desistir de mim e sempre estar de braços abertos para me receber; Ed, ter me reaproximado de você foi uma das melhores coisas que me aconteceu nos últimos tempos! Ro e Lufa, vocês dois são os presentes mais maravilhosos que a Bio-USP me deu. Não imagino minha vida sem a amizade de vocês daqui pra frente! Mari e Ari, já vocês duas são meus pacotinhos de amor da Bio-UNICAMP, obrigada por fazerem a distância não ter significado. Mary, meu líquen, minha companheira de tempos sombrios de cursinho, sempre vou carregar um carinho enorme por você! Carlos, obrigada por seu grande coração, por se importar comigo, me ouvir e sempre se mostrar disposto a me ajudar. Max, você esteve comigo durante as maiores batalhas da minha vida e nunca me deixou desistir ou abaixar a cabeça. Obrigada por sempre me fazer lembrar que eu sou capaz!

Aos meus familiares, que antes de agradecer preciso me desculpar pelos momentos de ausência. Vó, Tias, Primos e especialmente minha irmã Laura, que finge que não, mas que, eu sei que se preocupa comigo e que é alguém com quem posso contar. Obrigada pelos conselhos e ajuda! Mãe, você com certeza é os ser mais cheio de amor que eu conheço. Um exemplo de mulher e ser humano, sempre disposta ajudar quem possa. Muitas vezes fico te olhando e pensando como pode existir alguém tão especial como você e como sou sortuda de ser sua filha. Se um dia eu for metade do ser humano incrível que você é, eu estarei satisfeita. Eu não estaria escrevendo esse agradecimento se não fosse seu apoio, Mãe. Obrigada por acreditar em mim!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e processo nº 2017/23309-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

"A tartaruga que
andou
tanto tempo
e tanto viu
com
seus
antigos
olhos,
a tartaruga
que comeu
azeitonas
do mais profundo
mar,
a tartaruga que nadou
sete séculos
e conheceu
sete
mil
primaveras,
a tartaruga
blindada
contra
o calor
e o frio,
contra
os raios e as ondas,
a tartaruga
amarela
e prateada
com severos
lunares
ambarinos
e pés de rapina,
a tartaruga
ficou
aqui
dormindo
e não sabe

De tão velha
se foi
pondo dura,
deixou
de amar as ondas
e foi rígida
como o ferro de passar
Fechou
os olhos que
tanto
mar, céu, tempo e terra
desafiaram,
e dormiu
entre as outras
pedras."

Pablo Neruda

RESUMO

SILVA, I. S. **Detecção *de Chelonid alphaherpesvirus-5* (ChHV5) em sangue e órgãos de *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) e correlação com aspectos morfométricos em animais com e sem fibropapilomatose da costa de Ubatuba/São Paulo**. 2019. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A fibropapilomatose (FP) é uma neoplasia de origem epitelial caracterizada por tumores cutâneos. Foi reportada afetando todas as espécies de tartarugas-marinhas. As tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) são a espécie mais comum e gravemente afetada. A patogênese da doença ainda não está completamente elucidada, mas há um consenso na literatura de que a FP apresenta caráter multifatorial. O *Chelonid alphaherpesvirus-5* (ChHV5) é apontado como agente etiológico da FP, uma vez que diversos estudos moleculares demostraram a detecção deste vírus em amostras oriundas de neoformações cutâneas. Aspectos relativos à infecção e disseminação do ChHV5 no organismo do hospedeiro não estão totalmente esclarecidos. Considerando o exposto, o presente trabalho teve como objetivo a detecção de ChHV5 em amostras de *Chelonia mydas* acometidas e não acometidas pela FP, provenientes da área de alimentação de Ubatuba-SP e arredores. Buscou-se a detecção de ChHV5, bem como a caracterização molecular deste agente através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento. Foram avaliadas amostras de sangue (n=70), pele (n=20) e tumor (n=9) de 70 animais vivos e amostras de fígado (n=33), baço (n=32), gônadas (n=32), pulmões (n=6) e pele (=6) de 33 animais necropsiados. A prevalência de ChHV5 foi de 80% (16/20) nos animais vivos, sendo as amostras provenientes de diferentes órgãos tecidos: pele, sangue e tumor (quando presente) e 100% (33/33) dos animais necropsiados. O vírus foi detectado em todos os tipos de órgãos e tecidos avaliados, e em tartarugas acometidas e não acometidas pela FP. Não foi possível encontrar uma relação direta entre o grau de severidade da FP (FPS) e a condição corporal dos animais avaliados. Os animais com FPS severo tiveram o agente viral detectado em todos os órgãos e tecidos avaliados, caracterizando tais indivíduos como pontenciais dispersores do vírus. A detecção do ChHV5 em órgãos internos, indica possíveis locais de persistência viral. Especificamente em gônadas de animais sem tumores, levanta a hipótese da possibilidade de transmissão sexual ou vertical do ChHV5, assim como ocorre com outros alphaherpesvirus. A análise da qualidade da água de

praias de Ubatuba, onde foram coletados animais com ou sem sinais clínicos da FP, portadores do ChHV5 demonstrou que algumas regiões estão mais poluídas que outras. Porém, não possível encontrar uma relação clara entre alguns dos parâmetros analisados e a doença. As sequências de DNA polimerase de ChHV5 de amostras de sangue e tumor identificadas neste estudo tiveram 100% de identidade com sequências provenientes de Ubatuba/SP. Logo, um mesmo haplótipo do agente viral parece ser capaz de infectar diferentes tecidos do hospedeiro. Ademais, a sequência obtida de uma amostra de ovário neste estudo foi compatível com uma sequência encontrada em Fernando de Noronha/PE. Assim, os animais encontrados no Litoral Norte de São Paulo podem estar infectados por mais de um haplótipo viral e parecem capazes de transportar o vírus entre regiões distantes. As análises deste estudo permitiram a formulação de hipóteses que podem contribuir para a compreensão de aspectos relacionados à patogênese da doença e auxiliam no monitoramento do agente viral, podendo assim contribuir para os esforços na conservação das tartarugas-marinhas.

Palavras-chave: Tumores. Patogenia.Tartarugas-marinhas. Conservação.

ABSTRACT

SILVA, I. S. **Detection of *Chelonid alphaherpesvirus-5* (ChHV5) in blood and organs of *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) and correlation with morphometrics in animals with and without fibropapillomatosis in the coast of Ubatuba/São Paulo**. 2019. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Fibropapillomatosis (PF) is a neoplastic disease with epithelial origin characterized by skin tumors, and has been reported to affect all species of sea turtles. Green sea turtles (*Chelonia mydas*) are the most commonly and severely afflicted with fibropapillomatosis. The pathogenesis of the disease is not fully elucidated yet, however is a consensus in the literature that it has a multifactorial character. *Chelonid alphaherpesvirus-5* (ChHV5) is indicated as an etiological agent of PF, since several molecular studies have shown the detection of this virus in samples from cutaneous neoformations. How spread and dissemination of ChHV 5 occurrence in animals is not one that is fully understood. The present study aim to detect ChHV5 in samples of *Chelonia mydas* affected and not affected by PF, from the feeding area of Ubatuba-SP and surroundings. ChHV5 detection as well as molecular characterization of the agent were done through polymerase chain reaction (PCR) and sequencing techniques. Samples were collected from 70 live animals - blood (n = 70), skin (n = 20) and tumor (n = 9) and 33 of necropsied animals: liver (n = 33), spleen (n = 32), gonads (n = 32), lungs (n = 6) and skin (= 6). The prevalence of ChHV5 was 80% (16/20) in live animals - : skin, blood and tumor (when present) and 100% (33/33) of the necropsied animals. Virus was detected in all types of tissues evaluated, and in turtles affected and not affected by PF. Considering the severity of PF was not possible to relate a direct response between that and the body condition of evaluated animals. Animals affected with severe SPF had the viral agent detected in all organs and tissues evaluated, characterizing this type of event as virus spreaders. Detection of ChHV5 in internal organs indicates local possibilities of viral persistence, specifically in gonads of animal without tumors which suggests the hypothesis of a sexual or vertical transmission of ChHV5, as it happens with other alphaherpesviruses. The quality of the water in Ubatuba beaches - where samples were collected - was analyzed and showed that some areas are more affected than others considering pollution levels. However, it is not possible set the difference between some of the parameters analyzed and the disease occurrence. ChHV5 DNA

polymerase sequences from blood and tumor samples identified in this study had 100% identity with sequences from Ubatuba/SP. Thus, the same haplotype of the viral agent appears to be able to infect different host tissues. Moreover, the sequence obtained from an ovary sample in this study was compatible with a sequence found in Fernando de Noronha/PE. Thus, animals found on the North Coast of São Paulo may be infected by more than one viral haplotype and appear to be able to carry the virus between distant regions. Results of this study allow to formulate hypotheses that can contribute to the understanding of problems related to the disease pathogenesis and help in the monitoring of the viral agent, thus contributing to the control of sea turtles.

Keywords: Tumors. Pathogeny. Sea turtles. Conservation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 27
2 OBJETIVOS 30
2.1 GERAIS 30
2.2 ESPECÍFICOS 30
3 REVISÃO DE LITERATURA 31
3.1 AS TARTARUGAS-MARINHAS 31
3.2 AS TARTARUGAS-VERDES (*Chelonia mydas*) 31
3.3 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DAS TARTARUGAS-MARINHAS 33
3.4 AMEAÇAS ÀS TARTARUGAS-MARINHAS 35
3.5 A FIBROPAPILOMATOSE 35
3.5.1 Caracterização da doença 35
3.5.2 *Chelonid alphaherpesvirus*-5, o agente infeccioso 39
3.6 FATOR AMBIENTAL 43
4 MATERIAIS E MÉTODOS 48
4.1 ÁREA DE ESTUDO, MANEJO E SELEÇÃO DAS TARTARUGAS 48
4.1.1 Obtenção das amostras de animais que vieram a óbito 49
4.1.2 Obtenção das amostras de animais vivos 49
4.2 AVALIAÇÃO MOLECULAR 50
4.2.1 Preparação das amostras e extração de DNA 50
4.2.2 Extração de DNA 50
4.2.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) 51
4.2.4 Leitura e análise dos produtos da PCR 52
4.2.5 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos 52
4.2.6 Análises das sequências 52
4.2.7 Análise filogenética 53
4.3 ANÁLISE DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA DO MAR 53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 54
5.1 DADOS BIOMÉTRICOS E ESCORE DA FIBROPAPILOMATOSE 54
5.1.1 Animais necropsiados 54
5.1.2 Animais vivos 57
5.2 DETECÇÃO MOLECULAR DE ChHV5 EM TECIDOS 61
5.2.1 Detecção molecular de ChHV5 em gônadas de machos e fêmeas 67
5.2.2 Detecção de ChHV5 com diferentes genes-alvos 69
5.2.2.1 Órgãos 69
5.2.2.2 Amostras de sangue 70

5.2.3 Prevalência de ChHV5 em indivíduos acometidos e não acometidos pela fibropapilomatose 72
5.2.3.1 Animais necropsiados 72
5.2.3.2 Animais vivos 74
5.2.4 Caracterização molecular do ChHV5 76
5.3 DADOS DE QUALIDADE DA ÁGUA DAS PRAIAS DE UBATUBA 79
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 91
REFERÊNCIAS 94
APÊNDICE 113

1 INTRODUÇÃO

Todas as espécies de tartarugas marinhas encontram-se ameaçadas ou em risco de extinção, de acordo com a International Union for Conservation of Nature and Natural Resources - IUCN (MEYLAN, MEYLAN, 1999; IUCN, 2019), e com a lista de espécies ameaçadas do Brasil (ICMBIO, 2014).

As ações antrópicas como destruição de habitats (BUGONI et al., 2001), caça, pesca incidental, alterações climáticas, desenvolvimento costeiro (WITHERINGTON, 2000) bem como acometimento por doenças podem impactar negativamente na sobrevivência e na estrutura das populações de *Chelonia mydas* (MARCOVALDI et al., 2011).

A fibropapilomatose (FP) é uma neoplasia benigna de origem epitelial caracterizada por tumores cutâneos simples ou múltiplos de aspecto verrucoso ou liso, sésseis ou pedunculados, sendo encontrados principalmente em nadadeiras, pescoço, cabeça, região inguinal, axilar e base da cauda (HERBST, 1994; BAPTISTOTTE, 2007; ROSSI 2007). A FP foi reportada afetando todas as espécies de tartarugas-marinhas, entretanto a espécie mais acometida é a tartaruga-verde, *C. mydas*, por motivos ainda desconhecidos (HERBST, 1994; AGUIRRE et al., 1999; ROSSI et al., 2015a). O tamanho e a quantidade de lesões observadas podem comprometer a alimentação, natação, visão e condições fisiológicas, levando a casos crônicos de estresse e imunodepressão além da falência de órgãos (HERBST, 1994; AGUIRRE, 1998; WORK, BALAZS, 1999), sendo considerada uma doença debilitante que pode ser fatal (AGUIRRE et al., 1998).

Um alphaherpesvirus, *Chelonid alphaherpesvirus*-5 (ChHV5), tem sido consistentemente detectado em testes moleculares (PCR) em tumores (JACOBSON et al., 1991; HERBST et al., 1995a; QUACKENBUSH et al., 2001; WORK, 2005), sendo, por isso, considerado fator etiológico primário para a doença (HERBST, KLEIN, 1995b; HERBST et al., 1998). No entanto é consenso na literatura que a etiologia da doença é multifatorial, e pode também estar associada a fatores genéticos e ambientais e não apenas a um agente infeccioso (BALAZS, 1991; JACOBSON et al., 1991; ADNYANA et al., 1997; AGUIRRE et al., 1998). Acredita-se que poluentes presentes em praias impactadas pelas atividades humanas possam afetar a condição imunológica dos indivíduos infectados permitindo a manifestação clínica da FP por romper a latência do vírus, como descrito na literatura (HERBST,

KLEIN, 1995b), facilitando a infecção ou a persistência da doença. Fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento demográfico, às atividades industriais e agronômicas próximas a regiões costeiras, baías e lagos podem contribuir para o desenvolvimento e elevação da prevalência da doença (BALAZS, 1991; ADNYANA et al., 1997; VAN HOUTAN et al., 2010), visto que sua prevalência em ambientes marinhos antropizados é maior do que em indivíduos presentes em águas mais profundas e distantes da costa (HERBST, 1994).

Fatores ambientais, como temperatura, correntes marítimas, profundidade, luminosidade e pH da água também podem interferir na permanência de partículas virais viáveis no ambiente (CURRY et al., 2000). A presença de compostos orgânicos e *debris* celulares pode estabilizar o vírus e aumentar sua sobrevivência (CLARK et al., 1998). Alguns autores já associaram a FP com o tempo de exposição das tartarugas marinhas aos poluentes no desenvolvimento de tumores (ADNYANA et al, 1997; CHALOUPKA, BALAZS, 2005). Logo, as áreas de alimentação apresentam elevada importância nos estudos para o controle da qualidade da água, pois permitem compreender a relação entre o vírus e a ocorrência da doença nas tartarugas-marinhas.

Em função do mecanismo de latência, os indivíduos infectados podem atuar como reservatórios do vírus, até o momento que o agente seja reativado. Sob condições de estresse, exposição à radiação ultravioleta ou alteração das condições imunológicas do hospedeiro o patógeno migra até os tecidos, causando a liberação das partículas virais, permitindo então que ocorra a infecção de novos indivíduos, e assim, mantendo-se na população (STRAUSS, STRAUSS, 2006).

A disseminação do herpesvírus pode ocorrer através da saliva, secreções, aerossóis, fezes, células infectadas, ou contato sexual, mas esta característica tem sido pouco estudada em ChHV5 (GATTAMORTA, 2016a; MONEZI et al. 2016; CHAVES et al., 2017). Além disso, sua disseminação pode ocorrer mesmo na ausência de lesões (STRAUSS, STRAUSS, 2006; DERUELLE, FAVOREEL, 2011).

A detecção do DNA deste herpesvírus em tartarugas que não apresentam fibropapilomas sugere a detecção inicial de infecção subclínica ou reforça o mecanismo de latência deste patógeno (PAGE-KARJIAN et al., 2012; ALFARO-NUÑES et al., 2014; GATTAMORTA et al., 2017). A maioria dos herpesvírus estabelece uma infecção sistêmica pós-inoculação, onde o vírus está presente no sangue (PAGE-KARJIAN et al., 2015). Em indivíduos infectados, a viremia é um

indicativo de replicação viral e pode ser detectado durante um primeiro evento de infecção ou durante a reativação do vírus depois de um período de latência (PAILLOT et al., 2008).

A discussão sobre a latência de ChHV5 surgiu recentemente e segundo Alfaro-Nuñez et al. (2014) pode ter implicações importantes na compreensão dos mecanismos de infecção e, principalmente, na manifestação clínica da FP e de outras doenças associadas à herpesvírus em tartarugas-marinhas. A literatura relata a necessidade de pesquisas que elucidem os mecanismos de infecção pelo alphaherpesvirus, bem como a virulência deste agente, suas variantes, o estágio de vida que as infecções acontecem, e as taxas de mortalidade de *C. mydas* decorrentes da doença (JONES et al., 2016).

A importância de compreender a disseminação e etiologia das doenças em animais silvestres está diretamente ligada à conservação das espécies, principalmente no caso de espécies ameaçadas de extinção. A presença de patógenos é esperada em populações selvagens, no entanto, a mortalidade elevada e a interferência das doenças na estrutura populacional de cada espécie devem ser alvo de estudos constantes, particularmente para o caso em que patógenos circulam por áreas amplas e por longos períodos de tempo (CAUGHLEY, SINCLAIR, 1994).

Considerando os fatores e aspectos citados, é importante detectar a presença dos vírus em *Chelonia mydas* com e sem fibropapilomatose, a relação entre severidade da doença, variações no genoma viral e mecanismos de disseminação e infectividade do agente viral para avaliar os possíveis efeitos negativos para a conservação dessa espécie. O presente trabalho pretende contribuir para a compreensão de como os processos de latência e dispersão atuam na manutenção e variabilidade do patógeno, particularmente nas áreas de alimentação, que constituem importantes repositórios de indivíduos reprodutivos de *C. mydas*. Busca-se discutir as possíveis vias de dispersão e infecção do agente através da análise de órgãos internos e sangue, além de realiar uma avaliação molecular das sequências da DNA de ChHV5 detectadas através do método de PCR e sequenciamento. Ademais, esse trabalho visa detectar possíveis órgãos onde o ChHV5 pode manter latência, e ainda caracterizar infecções recentes ou a possível disseminação do agente através do sangue.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

- Detectar a presença de ChHV5 em amostras de sangue de C*helonia mydas* vivas acometidas e não acometidas pela fibropapilomatose por meio da técnica de PCR para as sequências das regiões UL18, UL27, UL30 e F-US3B;
- Detectar a presença de ChHV5 em amostras de fígado, baço e gônadas de *C.* mydas que vieram a óbito, acometidas ou não acometidas pela FP, através da detecção de sequências das regiões UL18, UL27, UL30 E F-US3B;
- Determinar a presença e o escore tumoral de FP e correlacionar com a presença do ChHV5 em tecidos e tumores;
- Detectar a presença de ChHV5 em sangue e outros tecidos e associar com o escore tumoral, para compreender a relação entre o escore e a disseminação do vírus ou rompimento da latência em áreas de alimentação;

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar uma possível correlação entre a doença e detecção de ChHV5 com parâmetros da qualidade da água do mar;
- Definir o melhor marcador molecular para a detecção de ChHV5 em sangue e outros tecidos de tartarugas-marinhas;
- Detectar a presença de ChHV5 em tecidos reprodutivos – gônadas, para avaliar a participação da via reprodutiva na dispersão do agente;
- Detectar a presença de ChHV5 em baço e fígado para avaliar o tropismo do agente;
- Através de sequenciamento de tecidos positivos para ChHV5, avaliar se a mesma variante viral estava presente em diferentes tecidos do mesmo animal.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AS TARTARUGAS-MARINHAS

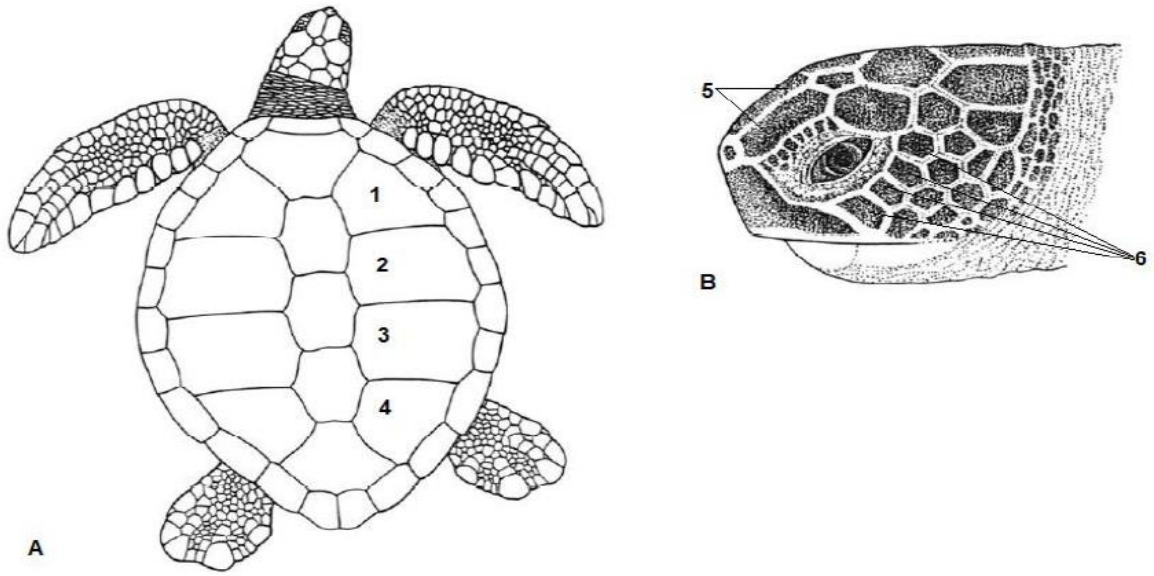
As tartarugas-marinhas são répteis pertencentes à ordem Testudines, caracterizadas por uma carapaça rígida formada pela fusão de ossos das costelas e vértebras. Essa carapaça é um caráter exclusivo compartilhado e extremamente conservado por 300 milhões de anos (ERNEST, BARBOUR, 1989; LUTZ, 1997). Atualmente, sete espécies de tartarugas-marinhas são reconhecidas, representadas por seis gêneros pertencentes à superfamília Chelonioidea e distribuídas nas famílias Cheloniidae: *Chelonia mydas, Caretta caretta, Eretmochelys imbricata, Lepidochelys olivacea, Lepidochelys kempii e Natator depressus* e Dermochelyidae: *Dermochelys coriacea* (PRITCHARD, 1996; MEYLAN, MEYLAN, 1999; JENSEN et al., 2013).

Dessas sete espécies, cinco utilizam as áreas litorâneas brasileiras para alimentação e sítio de desova: *Caretta caretta* (tartaruga cabeçuda), *Dermochelys coriacea* (tartaruga-de-couro), *Eretmochelys imbricata* (tartaruga-de-pente), *Lepidochelys olivacea* (tartaruga-oliva) e *Chelonia mydas* (tartaruga-verde).

3.2 AS TARTARUGAS-VERDES (*Chelonia mydas*)

A tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) foi inicialmente descrita em 1758 por Linnaeus como *Testudo mydas*, sendo renomeada em 1812 por Schweigger (FORMIA, 2002). A espécie apresenta ventre branco ou amarelo claro e é caracterizada pela carapaça óssea revestida por escudos córneos justapostos, com coloração variando entre tons de verde, oliva e marrom, e manchas ou padrões rajados e estriados (FORMIA, 2002). A identificação da espécie se baseia na presença de quatro pares de escudos laterais justapostos na carapaça, dois pares de escamas pré-frontais e quatro pares de escamas pós-orbitais na cabeça (PRITCHARD, MORTIMER, 2000) (Figura 1).

Figura 1 - *Chelonia mydas*. Prancha de identificação. A: quatro pares de placas laterais justapostas (1, 2, 3,4). B: escudos pré-frontais (5) e escudos pós-orbitais (6).



Fonte: Adaptado de Pritchard, Mortimer (1999) *apud* Zamana (2018).

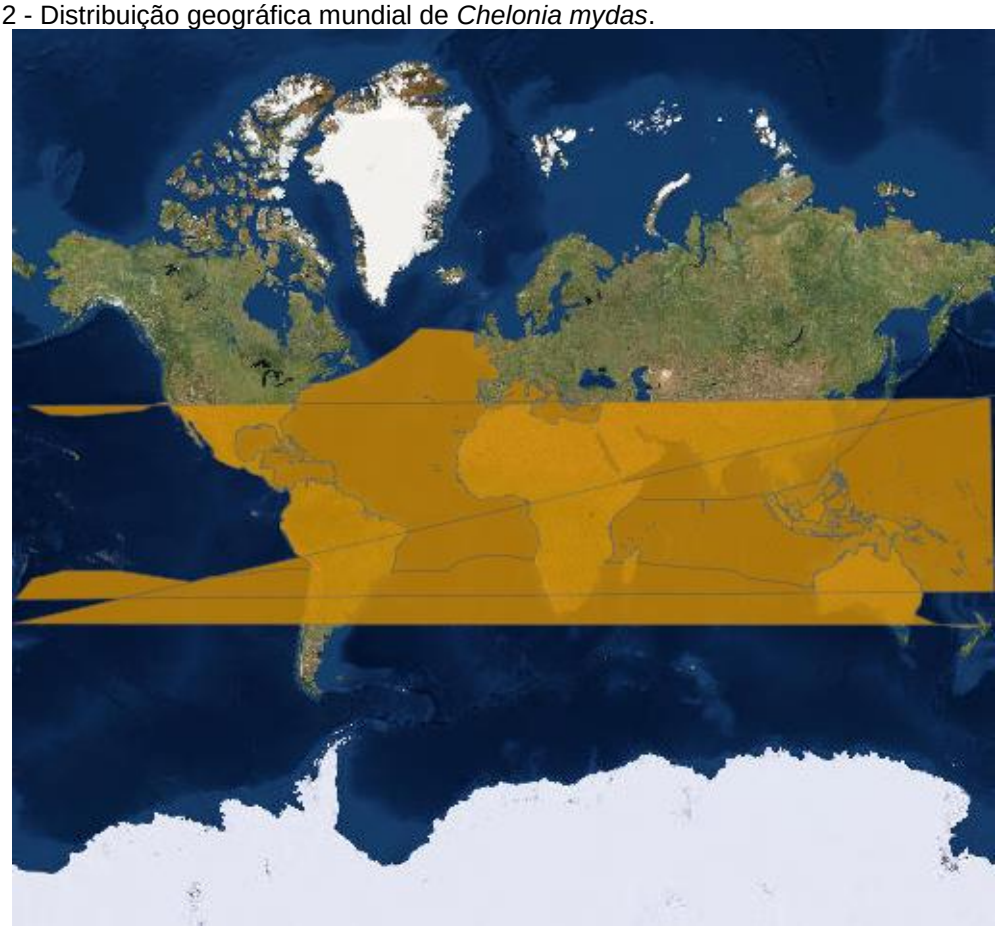
As tartarugas-verde são encontradas em águas tropicais e subtropicais, principalmente em regiões costeiras, ao redor de ilhas e também estuários de rios e lagos (HIRTH, 1997) como mostra a Figura 2. A maioria das tartarugas-marinhas possuem comportamento migratório durante sua vida. Essa migração ocorre depois da fase pelágica chamada de “anos perdidos”, após os filhotes recém-eclodidos realizarem deriva passiva, sendo levados pelas correntes marítimas (MEYLAN, MEYLAN, 1999).

Na primeira fase da vida, *C. mydas* apresenta hábitos onívoros, tornando-se progressivamente herbívora à medida que atinge a fase juvenil (BJORNDAL, 1997). Por alimentar-se de uma variedade de plantas aquáticas e algas, a espécie está exposta aos efeitos do uso do solo das áreas de alimentação que são locais da costa litorânea de diversas áreas do globo para onde os indivíduos juvenis dirigem-se ao atingirem um comprimento retilíneo de carapaça entre 20 a 30 cm. Estes locais constituem os “habitats de desenvolvimento” da espécie, que permanece associada a bancos de algas, utilizados para sua alimentação (MORTIMER, 1982; SPOTILA, 2004). Os indivíduos juvenis podem permanecer em uma mesma área de alimentação ou se deslocar entre elas, e mantém-se nestas áreas pela maior parte do seu ciclo de vida, onde se desenvolvem até atingirem a maturidade sexual (BALAZS, 1980; GULKO; ECKERT, 2004), que normalmente ocorre entre 25 e 50

anos de idade (CHALOUPKA et al., 2004). Os adultos então migram por longas distâncias, sendo principalmente as fêmeas que se dirigem ao local onde nasceram para reproduzir e desovar em praias, comportamento conhecido como *natal homing* ou filopatria (CARR, 1967; CARR et al., 1978; MEYLAN et al., 1990.).

As principais áreas de desova da tartaruga-verde estão localizadas em ilhas oceânicas: Ilha da Trindade/ES, Reserva Biológica do Atol das Rocas/RN e Arquipélago de Fernando de Noronha/ PE. Também há registros de desova no Litoral Norte da Bahia, além de raros registros nos estados do Rio Grande do Norte, Sergipe, Espírito Santo e Rio de Janeiro (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011a).

Figura 2 - Distribuição geográfica mundial de *Chelonia mydas*.



Fonte: IUCN - Red List of Threatened Species (2019)
Legenda: A área em marrom corresponde a área de ocorrência das tartarugas-verdes no mundo.

3.3 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DAS TARTARUGAS-MARINHAS

As tartarugas-marinhas tem uma grande importância cultural, para comunidades indígenas e caiçaras, além de sua importância econômica, uma vez que incentivam o ecoturismo em todo o mundo (DOBBS, 2001; GULKO, ECKERT,

2004). No entanto, esses animais desempenham papeis fundamentais, muitas vezes negligenciados, nos ecossistemas marinhos que serão descritos nos parágrafos seguintes.

O casco é uma característica que confere proteção para os representantes dos Testudines. Esta característica permite que esses animais sejam verdadeiros lares para epibiontes, garantindo taxas de dispersão (RAWSON et al., 2003) e forrageamento (FRICK et al., 2004) e assim sobrevivência (DELLINGER et al., 1997) aumentadas para esses organismos que ficam fixados em seus cascos. Ao carregar cracas, algas e outros epibiontes as tartarugas-marinhas fornecem alimentos para peixes e camarões que limpam seu casco. Ainda, as tartarugas-marinhas fornecem alimento por serem presas, principalmente quando ovos ou filhotes recém-nascidos (GYURIS, 1994). Ovos que não eclodiram, provém uma concentração importante de nutrientes vitais para dunas, que são ecossistemas com baixa disponibilidade de elementos como nitrogênio, fósforo e potássio, permitindo o crescimento de vegetação (BOUCHARD, BJORNDAL, 2000; HANNAN et al., 2007). Esses nutrientes são trazidos de áreas de forrageamento distantes, permitindo a ciclagem de nutrientes de ecossistemas marinhos pra ecossistemas terrestres (BJORNDAL, 2003).

As tartarugas-cabeçuda possuem mandíbulas fortes que as permitem se alimentar de presas duras, como crustáceos, triturando as conchas dessas presas. Os fragmentos resultantes da sua alimentação podem ser depositados no local onde houve a alimentação ou em sítios mais distantes através das fezes das tartarugas. Esse processo aumenta a taxa de reciclagem de nutrientes provenientes das conchas em ambientes bentônicos ou no fundo do mar (BJORNDAL, JACKSON, 2003).

As tartarugas-de-couro são as que possuem maior tamanho dentre as sete espécies e se alimentam de águas-vivas, desempenhando importante papel como predadoras desses animais (GIBBONS, RICHARDSON, 2009). O declínio das populações de tartarugas-de-couro, juntamente com o declínio de espécies de peixes também predadores por possuírem valor comercial, pode comprometer o controle populacional de águas-vivas (PURCELL et al., 2007).

As tartarugas-de-pente possuem uma boca em forma de bico que as permite se alimentar de esponjas marinhas, mudando a composição de espécies em recifes de corais (MEYLAN, 1988). Estas competem por espaço com corais construtores de

recifes. Sem as tartarugas-de-pente, as esponjas provavelmente mudariam toda a estrutura dos recifes ao dominarem a comunidade (LEON, BJORNDAL, 2002).

Em mar aberto, tartarugas-marinhas, especialmente as tartarugas-olivas, ao emergirem da água para tomar sol, expõem o centro de sua carapaça que se torna uma superfície onde aves marinhas podem se proteger de predadores, descansar e se alimentar de pequenos peixes que buscam proteção. Dessa forma, são recursos importantes para esses dois organismos marinhos (PITMAN, 1993).

As tartarugas-verdes são umas das poucas espécies de grandes herbívoros que se alimentam de ervas-marinhas, permitindo que haja aumento de produtividade e ganho de nutrientes para esses organismos (BJORNDAL, 1980; THAYER, 1984). Sem a constante pastagem, os bancos de algas crescem muito obstruindo correntes e impedindo a incidência de luz, causando decomposição (ZIEMAN et al., 1999; JACKSON et al., 2001).

3.4 AMEAÇAS ÀS TARTARUGAS-MARINHAS

Em todo o mundo, as populações de tartarugas-marinhas estão em declínio devido á atividades humanas (BJORNDAL, JACKSON, 2003). Todas as espécies de tartarugas marinhas encontram-se ameaçadas ou em risco de extinção, de acordo com a IUCN (MEYLAN, MEYLAN, 1999; IUCN, 2019; DUFFY, MARTINDALE, 2019), e com a lista de espécies ameaçadas do Brasil (ICMBIO, 2014).

Além das causas de mortes naturais, ações antrópicas como destruição de habitats (BUGONI et al., 2001), caça, pesca incidental ou intencional, alterações climáticas, desenvolvimento costeiro, ingestão de lixo, poluição dos mares (WITHERINGTON, 2000), e a ocorrência de patógenos e doenças, vêem impactando negativamente na sobrevivência e na estrutura das populações de *C. mydas* (BJORNDAL, 1995; HERBST, KLEIN, 1995A; LUTZ, 2002; VAN HOUTAN et al., 2010; MARCOVALDI et al., 2011).

3.5 A FIBROPAPILOMATOSE

3.5.1 Caracterização da doença

Uma doença que vem preocupando a comunidade científica e os grupos de conservação é a fibropapilomatose (FP). Trata-se de uma neoplasia benigna de origem epitelial caracterizada por tumores cutâneos simples ou múltiplos, com o tamanho variando entre 0,1 e 30cm de diâmetro, de aspecto verrucoso ou liso, sésseis ou pedunculados, sendo encontrados principalmente em nadadeiras, pescoço, cabeça, regiões inguinal e axilar, e base da cauda (HERBST, 1994; BAPTISTOTTE, 2007; ROSSI, 2007).

FP foi reportada acometendo *Caretta caretta*, *Dermochelys coriacea*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea*, *Lepidochelys kempii* e *Natator depressus,* mas a espécie mais afetada é a *Chelonia mydas*, por motivos ainda desconhecidos, recebendo o *status* de doença panzoótica e emergente, tendo sido reportada na grande maioria das bacias oceânicas onde esta espécie é encontrada (HERBST, 1994; WILLIANS et al., 1994; AGUIRRE et al., 1999; ROSSI et al., 2015a; JONES et al., 2016).

O tamanho e a quantidade de tumores podem comprometer a alimentação, natação, visão e condições fisiológicas, levando a casos crônicos de estresse, imunodepressão e a falência de órgãos (HERBST, 1994; AGUIRRE, 1998; WORK, BALAZS, 1999). Grandes massas cutâneas, quando ulceradas e necróticas, servem como porta de entrada para patógenos, contribuindo para possíveis ampliações de mortalidade dos animais acometidos (HERBST, 1994). Sendo assim, considerada uma doença debilitante e fatal (AGUIRRE et al., 1998).

O primeiro relato de FP data de 1936 e se trata de um indivíduo de *C. mydas* no aquário de Nova Iorque, oriundo da Flórida, EUA (SMITH, COATES, 1938). Logo depois, foi registrada em tartarugas-verdes de vida livre na Flórida (LUCKE, 1938; SMITH; COATES, 1938). No Brasil o primeiro relato ocorreu em 1986 na costa do Espírito Santo também em *C. mydas* (BAPTISTOTTE, 2007). Já foram encontrados indivíduos afetados por FP nos estágios de vida: juvenis, subadultos e adultos, não existindo registro em filhotes e pós-filhotes (HERBST, 1994).

No Brasil, e em demais áreas do mundo, o monitoramento da fibropapilomatose demonstram prevalências e manifestações clínicas variadas da doença (STACY, 2016). A prevalência registrada no Brasil (BAPTISTOTTE, 2016), quando comparada com outros países, possui uma frequência de leve à moderada, sendo mais alta em alguns estados do nordeste como Ceará (32,59%), Rio Grande do Norte (21,18%), Paraíba (26,06%), Alagoas (13,91%), Sergipe (13,92%), Bahia

(22,66%), além de Espírito Santo (21,06%), Rio de Janeiro (20,20%) e São Paulo (10,43%) entre os anos de 2000 e 2014.

No Brasil, foram realizados exames histopatológicos, imuno-histoquímicos, ultra-estruturais e moleculares em amostras de tecidos tumorais, além de análises hematológicas, bioquímicas e moleculares em sangue, com o objetivo de elucidar a etiologia da FP em tartarugas-marinhas (MATUSHIMA et al., 1999, 2001, 2005; MATUSHIMA, 2003; MONEZI et al., 2012). Estudos posteriores foram realizados, visando à detecção e caracterização do ChHV5 (MEHNERT et al., 2001; MONEZI et al., 2006; RODENBUSCH et al., 2012; GATTAMORTA, 2015; GATTAMORTA et al., 2016a; GATTAMORTA et al., 2016b; MONEZI et al., 2016; ZAMANA, 2018). Também foram desenvolvidos estudos sobre análise do perfil hematológico e da atividade celular de leucócitos sanguíneos de animais com e sem os tumores (ROSSI, 2007; ROSSI et al. 2009a; ROSSI et al. 2009b; ROSSI et al. 2013a e 2013b; ROSSI et al. 2016a; ZWARG et al. 2014); estudos sobre distribuição anatômica de fibropapilomas (SANCHEZ-SARMIENTO et al., 2012a); índice de condição corporal (SANCHEZ-SARMIENTO et al., 2012b, 2013a, 2013b; ROSSI et al., 2015b); proposta de escores para determinar o grau de severidade da doença (ROSSI et al., 2012a e 2013c, 2016b) e avaliação de leucócitos sanguíneos e a possível relação entre bifenilaspolicloradas e FP (ROSSI et al. 2012b; ROSSI et al. 2013d e 2013e; ROSSI, 2014; ROSSI et al., 2015c) e presença de contaminantes ambientais (SANCHEZ-SARMIENTO et al., 2011; SANCHEZ-SARMIENTO et al., 2016; VILCA et al, 2013; PRIOSTE et al., 2014, PRIOSTE et al., 2015a; PRIOSTE et al., 2015b; VILCA et al., 2015; PRIOSTE et al, 2016; FULLER, PRIOSTE, MATUSHIMA, 2015).

O diagnóstico da doença pode ser realizado pela observação dos tumores, que devem ser posteriormente confirmados por avaliação histopatológica, caracterizada por projeção papilar e marcante hiperplasia da epiderme, proliferação de fibroblastos, presença de feixes de fibra de colágeno na derme e corpúsculos de inclusão (MATUSHIMA et al., 2001; MATUSHIMA et al., 2003; GREENBLATT et al., 2005).

Herbst et al. (1998) utilizaram anticorpos de indivíduos inoculados experimentalmente, que permitiu a confirmação para alphaherpesvirus em animais positivos para as lesões fibropapilomatosas, mas não para animais que não apresentavam a lesão. Estudos de transmissão, já demonstravam o envolvimento de

um vírus envelopado na etiologia da FP (HERBST et al., 1995) e a presença de partículas associadas a tumores, sugerindo a infecção por herpesvirus (JACOBSON et al., 1991). As tentativas de isolamento do vírus não foram bem-sucedidas (WORK et al., 2009). Em 2017, em uma cultura organotípica de pele de tartaruga, incluindo fibroblastos tumorais de fibropapiloma e queratinócitos de tartaruga, foi demonstrada a formação de corpúsculos de inclusão intranucleares, evidenciando a atividade lítica do vírus (WORK et al., 2017).

Em tartarugas-marinhas, achados necroscópicos associados ao herpesvírus incluem hepatomegalia e edema pulmonar e já foram observados corpúsculos de inclusão em pulmão, rim e pâncreas na avaliação histopatológica (MARSCHANG, 2011). A doença do pulmão-olho-traquéia (LETD), observada em tartarugas-verdes (JACOBSON et al., 1986), demonstrou a presença de pneumonia associado a presença de herpesvírus conhecido como *Chelonid herpesvirus 6* (DAVISON et al. 2009).

As tartarugas com grandes quantidades de tumores cutâneos também podem apresentar tumores internos, localizados em pulmões, coração, fígado, rins e trato gastrointestinal (BALAZS, 1998; WORK, BALAZS, 1999; AGUIRRE et al., 2001). Estes são descritos como fibromas, mixofibromas ou fibrossarcomas de baixo grau de malignidade, mas que podem gerar disfunção orgânica e morte (WORK, 2016). Alguns autores supõem que esses tumores viscerais estão presentes na fase tardia da doença e são consideradas lesões crônicas (JACOBSON et al., 1989). Lesões causadas por herpesvírus já foram estudadas em outras espécies e os achados histopatológicos e de microscopia eletrônica de transmissão permitiram identificar a presença de corpúsculos de inclusão e vírions em diversos tecidos (CATOI et al., 2014). Alterações em órgãos são comuns em animais no Havaí (WORK et al., 2004). No Brasil, poucos registros de tumores viscerais foram realizados, sugerindo uma diferença na manifestação da doença aqui quando comparada com outros países (DUTRA; NASCIMENTO; FUTEMA, 2012; ROSSI et al., 2016; CRUZ-OCHOA, 2017).

No estado do Pernambuco, nódulos viscerais caracterizados como fibromas foram descritos nos pulmões, pele e estômago, em *Chelonia mydas* (BRITO et al., 2004). Um dos tumores internos de um animal do Brasil possuía características histológicas diferentes das descritas para tumores internos no Havaí e foram caracterizados como fibromas. Esses tumores estavam presentes em pulmões,

coração e rins de *Chelonia mydas* provenientes do Aquário de Santos, Litoral Sul de São Paulo, que também apresentavam tumores externos. No entanto, nesse estudo não foi realizada a detecção molecular do ChHV5 (DUTRA; NASCIMENTO; FUTEMA, 2012). Em necropsias realizadas em tartarugas verdes acometidas pela FP provenientes do Espírito Santo, São Paulo e Bahia, foi registrada a presença de tumores internos, na cavidade oral e esôfago (ROSSI et al., 2016). Em 2017 foi relatada a presença de fibroma em pulmões de tartarugas-verdes de Ubatuba/SP (CRUZ-OCHOA, 2017).

3.5.2 *Chelonid alphaherpesvirus*-5, o agente infeccioso

Um alphaherpesvirus, *Chelonid alphaherpesvirus*-5 (ChHV5), tem sido consistentemente detectado em testes moleculares (PCR) em tumores (LACHOVICH et al., 1999; LU et al., 2000; QUACKENBUSH et al., 2001; HERBST et al., 2004; ENE et al., 2005; DUARTE et al., 2012; PATRICIO et al., 2012; RODENBUSCH et al., 2014; GATTAMORTA, 2015; MONEZI et al., 2016), sendo, por isso, considerado fator etiológico para a doença (HERBST, KLEIN, 1995b; HERBST et al., 1998). Contudo, alguns estudos sugerem a FP é uma doença de caráter multifatorial, logo, pode também estar associada a fatores genéticos e ambientais e não apenas a um agente infeccioso (BALAZS, 1991; JACOBSON et al., 1991; ADNYANA et al., 1997; AGUIRRE et al., 1998; DUFFY et al., 2018; DUFFY, MARTINDALE, 2019).

As análises filogenéticas das sequências de ChHV5 identificaram o gênero do vírus como *Scutavirus,* subfamilia Alphaherpesviridae*,* família Herpesviridae ordem Herpesvirales (MCGEOCH, GATHERER, 2005; ICTV, 2019). Os herpesvírus são constituídos por uma dupla fita de DNA linear, um capsídeo de simetria icosaédrica e um envelope lipídico com projeções em sua superfície. Seus vírions são envelopados e apresentam um tamanho entre 100-300nm, apresentam uma biologia complexa, em função de sua habilidade de estabelecer infecções latentes, geralmente assintomáticas, por um longo período de vida em seu hospedeiro (STRAUSS, STRAUSS, 2008).

A latência é estabelecida em um conjunto específico de células, enquanto um conjunto diferente de células é infectado durante a replicação do vírus no hospedeiro. Esta segunda fase é conhecida por ciclo lítico ou de replicação, e

normalmente é fatal para as células infectadas. Em alguns casos, no entanto, essas infecções podem apresentar um quadro sintomático grave, gerando repercussões clínicas severas, mesmo quando se encontra latente nos tecidos (STRAUSS, STRAUSS, 2008).

Devido ao mecanismo de latência, os indivíduos infectados podem atuar como reservatórios do vírus, até o momento em que o agente seja reativado. Sob condições de estresse, exposição à radiação ultravioleta ou alteração das condições imunológicas do hospedeiro, o patógeno migra até os tecidos em que desenvolve sua replicação, liberando partículas virais que podem então infectar novos indivíduos mantendo-se na população do organismo infectado (STRAUSS, STRAUSS, 2008; GATTAMORTA, 2016a).

Apesar do mecanismo de latência ser conhecido para alguns alphaherpesvirus, é pouco elucidado na literatura científica como isto ocorre com o ChHV5, assim como o mecanismo de infecção, sua virulência, variantes, o estágio de vida e as taxas de mortalidade causadas em *C. mydas* pela FP (GATTAMORTA, 2016a). Testes para detecção de infecções subclínicas ou latentes não foram desenvolvidos, sendo um dos aspectos mais relevantes na compreensão da resposta imunológica à presença do herpesvírus (HERBST et al., 1995). Em tartarugas-verdes, acredita-se que uma série de fatores ambientais poderia influenciar na reativação do vírus, como uso do solo e presença de poluentes (BALAZS, 1991; ADNYANA et al., 1997, HERBST, KLEIN, 1995; VAN HOUTAN et al., 2010).

A disseminação dos herpesvírus em geral pode ocorrer através da saliva, secreções, aerossóis, fezes, células infectadas, ou contato sexual. No entanto, esta característica do vírus ainda não está elucidada para ChHV5 (GATTAMORTA, 2016a; MONEZI et al. 2016; CHAVES et al., 2017). Além disso, é importante ressaltar que o vírus pode se disseminar mesmo na ausência de lesões (STRAUSS, STRAUSS, 2006; DERUELLE, FAVOREEL, 2011). Em 2015, foi detectada pela primeira vez a presença ChHV5 em secreção oral de uma tartaruga-verde sem tumores de Fernando de Noronha/PE (GATTAMORTA, 2015).

A detecção do DNA deste herpesvírus em tartarugas que não apresentam fibropapilomas sugere a detecção inicial de infecção subclínica ou reforça o mecanismo de latência neste patógeno (PAGE-KARJIAN et al., 2012; ALFARO-NUÑES et al., 2014; GATTAMORTA et al., 2017). A maioria dos herpesvírus

estabelece uma infecção sistêmica pós-inoculação, quando o vírus está presente no sangue (PAGE-KARJIAN et al., 2015). Em indivíduos infectados, a viremia é um indicativo de replicação viral e pode ser detectada durante um primeiro evento de infecção ou durante a reativação do vírus depois de um período de latência (PAILLOT et al., 2008).

Monezi et al. (2006) comprovaram a presença de herpesvírus no sangue de animais com fibropapilomas circulantes em águas brasileiras, corroborando com os dados encontrados por outros autores (HERBST, 1994; MEHNERT et al., 2001). Page-Karjian e colaboradores (2015) encontraram DNA circulante de ChHV5 em amostras de sangue de tartarugas sintomáticas e assintomáticas. Tal constatação sugere um mecanismo fundamental de transporte do vírus do local inicial da infecção ou latência para a pele ou vice-versa. A determinação do modo de transmissão em populações aparentemente livres de FP pode ter implicações no desenvolvimento de efetivas estratégias de controle e prevenção (HERBST et al., 2008). No entanto, na literatura científica ainda são escassos os estudos que buscam detectar ChHV5 em amostras de sangue de animais acometidos e não acometidos por FP (MONEZI et al., 2016).

A forma como o ChHV5 é transmitido entre os indivíduos ainda não está esclarecida. A sanguessuga *Ozobranchus* sp. tem sido apontada com um candidato a vetor do vírus, por ser encontrada parasitando o epitélio destes animais e em função das elevadas cargas virais detectadas nestes parasitas (GREENBLATT et al., 2004). Em um estudo experimental, detectou-se que os herpesvirus capazes de causar LETD podem permanecer no ambiente aquático por até cinco dias, sendo capazes de causar efeito citopático em culturas de células (CURRY et al., 2000).

Além da detecção de ChHV5 em tumores, o vírus foi detectado em *Chelonia mydas* com FP em pele (LU et al., 2000; QUACKENBUSH et al., 2001; PAGE-KARJIAN et al., 2012), cérebro, nervos, língua, tireóides, pulmões, coração, fígado, baço, rins, tecido periorbital, vesícula biliar, intestinos, vesícula urinária, ovários e testículos mesmo na ausência de lesões (LU et al., 2000). Também houve a detecção em secreções orais, oculares e cloacais (GATTAMORTA, 2015; MONEZI et al., 2016; CHAVES et al., 2017), sangue, urina e plasma (PAGE-KARJIAN et al., 2015; PAGE KARJIAN et al., 2017). No trabalho de Lu e colaboradores (2000), para maioria dos tecidos, de 80 a 90% foram positivos para o agente viral, diferentemente das análises em fígado e vesícula urinária, onde 47-50% foram positivos.

Quackenbusch et al. (2001) detectaram a presença do agente em fígado, cérebro, gônadas, coração e pulmões em níveis significantemente mais baixos do que em tumores, através de PCR quantitativo. Page-Karjian et al. (2017) encontrou em seu estudo uma maior detecção de ChHV5 nos rins, seguido dos tumores.

Estudos recentes detectaram a presença de ChHV5 em tartarugas não acometidas pelos tumores cutâneos (GATTAMORTA, 2015; ALFARO-NUNEZ et al., 2016); secreções orais, oculares e cloacais (GATTAMORTA, 2015; CHAVES et al., 2017); rins, coração, e nervos (PAGE-KARJIAN et al., 2017); sangue e urina (PAGE-KARJIAN et al., 2015). Nestes mesmos animais, outros órgãos também foram investigados para a presença do herpesvírus dentre eles: cérebro, pulmões, baço, fígado, músculo esquelético, vesícula biliar, jejuno, adrenais e gônadas (LU et al., 2000; PAGE-KARJIAN et al., 2017), sendo os resultados negativos.

A variabilidade na distribuição de tecidos onde ChHV5 foi detectado pode ser atribuído à diferença na sensibilidade dos métodos utilizados, assim como a distribuição do DNA viral em cada animal no momento da coleta. Essa distribuição representa o retrato do agente no momento da morte da tartaruga, que depende do estágio do ciclo da infecção, presença ou ausência de viremia e estado imune do hospedeiro (PAGE-KARJIAN et al., 2017).

No Brasil, o agente viral foi detectado em tumores (RODENBUSCH et al., 2014; GATTAMORTA, 2015; MONEZI et al., 2016; ZAMANA, 2018), secreções, (GATTAMORTA, 2015; MONEZI et al., 2016) pele (GATTAMORTA, 2015; ZAMANA, 2018), cérebro (GATTAMORTA, 2015) e pulmões (ZAMANA, 2018) de animais acometidos pela FP. Segundo a presente revisão, em tartarugas não acometidas pela FP há registro, apenas, da detecção em pele (GATTAMORTA, 2015; ZAMANA, 2018), secreções, cérebro (GATTAMORTA, 2015) e pulmões (ZAMANA, 2018).

Em outras infecções ocasionadas por herpesvirus, infecções subclínicas e latentes foram determinadas nos rins, nervos cranianos e tecidos linfóides (CHEN; HUDNALL, 2006; GILDEN et al., 2011). Page-Kargian e colaboradores (2017) acreditam que, se o ChHV5 tiver comportamento semelhante aos demais herpesvirus, esses podem ser possíveis locais de persistência viral.

Com base na sequência de nucleotídeos, Herbst et al. (2004) e Ene et al. (2005) determinaram quatro variantes virais na Flórida, denominadas A, B, C e D, sendo que diferentes espécies de tartarugas-marinhas da mesma área geográfica

compartilharam a mesma variante, o que indica que a FP é geográfica e/ou regionalmente específica.

Em 2012, Patricio e colaboradores obtiveram sequências detectadas em Porto Rico e Golfo da Guiné. Em 2014, no Brasil, Rodenbusch e colaboradores identificaram as variantes 1, 2 e 4 presentes em Ubatuba/SP e em 2015, Gattamorta, detectou a mesma variante viral que a detectada por Patricio et al. (2012), o que sugere que estes vírus podem circular entre diferentes regiões. Gattamorta (2015), também investigou a possível relação das variações de sequências do ChHV5 e os haplótipos de tartarugas-verdes em regiões da costa brasileira. Assim, foi possível detectar a presença da mesma variante viral em secreções de indivíduos pertencentes a haplótipos diferentes, demonstrando que o ChHV5 no Oceano Atlântico pode infectar animais provenientes de diferentes áreas de reprodução.

Morrison et al. (2018) demonstraram que há diferenças consideráveis entre cepas virais de acordo com a localização geográfica, através de uma análise *multi-loci*. No Havaí há prevalência de tumores orais, que não são encontrados na Flórida. Também foi observado um declínio de casos no Havaí, e aumento de casos na Flórida. Isto pode estar relacionado a variantes virais e, ao obter dados de sequências, a variação geográfica do agente e sua possível relação com a manifestação da doença pode ser melhor compreendida (MORRISON et al., 2018). O autor sugere a possibilidade de co-infecção interespécies possivelmente latente por variantes geográficas diferentes graças à migração das tartarugas-marinhas durante sua vida, bem como a evolução dos vírus por recombinação, demonstrada entre as cepas do Havaí e da Flórida, o que pode ter impactado a virulência (MORRISON et al., 2018).

Em outras infecções virais, estudos demonstraram que diferentes variantes podem apresentar diferentes graus de virulência, assim como diferenças na apresentação e severidade da doença (LAEGREID et al., 1993; KAASHOEK et al., 1996; BERUMEN et al., 2001; ZHANG et al., 2001; YUNIS; JAROSINSKI; SCHAT, 2004).

3.6 FATOR AMBIENTAL

As tartarugas-verdes, por permanecerem em regiões costeiras durante a fase juvenil e de alimentação, são especialmente afetadas pela degradação das áreas

costeiras. Herbst, em 1994 foi um dos primeiros autores a propor uma possível relação entre a qualidade da água e a presença de tumores, sugerindo que contaminantes químicos presentes na água possivelmente agiam como imunotoxinas ou causavam danos diretos a nível celular e/ou genético. Assim, haveria a manifestação clínica ao romper a latência do ChHV5, como descrito na literatura (HERBST, KLEIN, 1995b), facilitando a infecção ou a persistência da FP.

Fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento demográfico, às atividades industriais e agronômicas próximas a regiões costeiras, baías e lagos podem contribuir para o desenvolvimento doença (BALAZS, 1991; ADNYANA et al., 1997; FOLEY et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2010; VAN HOUTAN et al., 2010), visto que sua prevalência em ambientes marinhos antropizados é maior do que em indivíduos presentes em águas mais profundas e distantes da costa (HERBST, 1994; ADNYANA et al., 1997; FOLEY et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2010; VAN HOUTAN et al., 2010).

Fatores ambientais, como temperatura, correntes marítimas, profundidade, luminosidade e pH também podem interferir na permanência de partículas virais viáveis no ambiente (CURRY et al., 2000). A presença de compostos orgânicos e *debris* celulares podem estabilizar o vírus e aumentar sua sobrevivência (CLARK et al., 1998). Uma tendência sazonal foi observada na Florida, quando temperaturas mais quentes da água durante o verão e outono promovem o crescimento das lesões (HERBST, 1994; HERBST et al., 1995).

Muitas das áreas de alimentação encontram-se bastante impactadas pelas atividades humanas, seja pelas alterações físicas do habitat e de uso do solo, seja pelo lançamento de efluentes sanitários e industriais a que os animais estão sujeitos durante a permanência nestas áreas (BALAZS, 1991; HERBST, KLEIN, 1995; ADNYANA et al., 1997; VAN HOUTAN et al., 2010). Este é o caso da região de Ubatuba/SP, que é particularmente sujeita a lançamento de efluentes sanitários sem tratamento prévio (SÃO PAULO, 2018).

Reconhecido como uma importante área de alimentação e refúgio de tartarugas-verdes no Atlântico Sul (GALLO et al., 2006), o município de Ubatuba possui uma população residente estimada em 89.747 habitantes (IBGE, 2018), mas esta população pode aumentar significativamente em feriados e no verão.

Apenas 39% do esgoto da região de Ubatuba é coletado pelo sistema de esgoto sanitário, e destes 39%, 100% é tratado antes do lançamento em corpos

d’água na cidade (SÃO PAULO, 2018). Das 78 praias do município, 24 são monitoradas pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB semanalmente, conforme critérios definidos pela resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA 274/2000. Em 2016, 50% (13) dos pontos monitorados permaneceram Próprios para banho o ano todo, sendo que 8% (2) apresentaram qualificação anual Ótima e 42% (11) apresentaram qualificação anual Boa. Dentre os demais pontos monitorados, 42% (11) receberam qualificação anual Regular e 8% (2) apresentaram qualificação Péssima. Comparando-se com dados de 2015, as praias do município de Ubatuba apresentaram piora na qualidade de suas águas, pois o número de praias que permaneceram 100% do tempo Próprias para banho diminuiu, aumentando o grupo das praias com classificação Regular e Péssima.

No relatório referente a 2017, elaborado pela CETESB, 57% (15) dos pontos monitorados permaneceram 100% do tempo Próprios para banho, sendo que 11% (3) tiveram classificação anual Ótima e 46% (12) receberam classificação Boa. Dentre os demais pontos, 31% (8) foram classificados como Regulares, 8% (2) como Ruins e 4% (1) como Péssimos. Comparando-se com o ano anterior, as praias do município de Ubatuba apresentaram melhora na qualidade de suas águas. O número de praias que permaneceram 100% do tempo Próprias para banho aumentou 7%, dentre essas as Ótimas aumentaram 3%. Houve redução de 50% das praias classificadas como Péssimas. O relatório de 2018 ainda não foi divulgado.

Existe uma série de evidências que apontam para a infecção por ChHV5 nas áreas de alimentação: uma maior densidade de indivíduos nestas áreas e a possibilidade de contato entre estes indivíduos e variantes regionais do herpesvírus comuns aos animais de cada uma destas áreas ou regiões (RODENBUSCH et al., 2014; ENE et al., 2005; HERBST et al., 2004; QUACKENBUSH et al., 1998; GATTAMORTA et al., 2017).

Estudos de Van Houtan e colaboradores (2010) apontam que o uso do solo pode estar associado à maior prevalência de FP. Foram elaborados no Havaí mapas de uso do solo que associados à prevalência da doença, demonstraram que elevadas concentrações de nitrogênio, processos de eutrofização e presença de algas invasoras apresentaram relação com a maior frequência de animais com lesões cutâneas fibropapilomatosas (VAN HOUTAN et al., 2010). Este mesmo trabalho encontrou aumento na concentração de arginina na dieta de tartarugas-verdes, decorrente da proliferação de macroalgas invasoras, que também tem sido

associada ao aumento da prevalência da doença. Em outro trabalho, os mesmos autores demonstraram correlação entre a eutrofização das áreas com o aumento de 14 vezes na ingestão de arginina por *Chelonia mydas* (VAN HOUTAN et al., 2014). A arginina é um regulador da atividade imune (PERANZONI et al., 2008), é um importante componente das glicoproteínas presentes no envelope viral dos herpesvirus e poderia contribui para a formação tumoral (MANNICK et al., 1994; VAN HOUTAN et al., 2010, 2014)

No Brasil, foi encontrada uma maior prevalência de FP em animais residindo em praias com baixa qualidade de água. No entanto, este estudo baseou-se na presença de macrófitas bentônicas e níveis de nutrientes, e não avaliou a poluição e a presença de contaminantes químicos (DOS SANTOS et al., 2010).

A associação entre a alta prevalência de FP com a degradação dos ambientes marinhos devido a atividades antropogênicas e poluição nas regiões costeiras ainda é pouco compreendida. O monitoramento da doença em tartarugas-marinhas é um indicador de saúde dos ecossistemas marinhos (AGUIRRE, LUTZ, 2004).

A presença de ChHV5 tanto em secreções, como em sangue e saliva de animais com FP vem sendo detectada nos EUA (PAGE-KARJIAN et al. 2015), na Costa Rica (CHAVES et al., 2017) e no Brasil (MONEZI et al., 2006; GATTAMORTA et al., 2016) e pode estar diretamente relacionada ao ciclo lítico do agente e apresentar uma das possíveis vias de infecção e disseminação do vírus. Secreções são apontadas como um dos carreadores de partículas virais, particularmente de herpesvírus (PAGE-KARJIAN et al., 2015; MONEZI et al., 2006; 2016; GATTAMORTA et al., 2016; CHAVES et al., 2017).

Além disso, a detecção de ChHV5 em diferentes tecidos nos permite avaliar a presença de uma mesma ou diferentes variantes virais através da comparação das sequências de nucleotídeos, favorecendo a compreensão da relação parasita-hospedeiro e sua associação com a latência do herpesvírus e possíveis rotas de transmissão viral (GATTAMORTA, 2015). Há uma forte preocupação com a conservação de tartarugas-marinhas, a relação entre o vírus, sua forma de transmissão, as taxas de mortalidade em decorrência da FP e a reposição das populações ao longo do tempo (CAUGHLEY, SINCLAIR, 1994).

A discussão sobre a latência de ChHV5 surgiu recentemente (ALFARO-NUÑEZ et al., 2014) e pode ter implicações importantes na compreensão dos

mecanismos de infecção e, principalmente, na manifestação clínica da FP e outras doenças associadas a herpesvírus em tartarugas-marinhas. A literatura relata a necessidade de pesquisas que elucidem os mecanismos de infecção pelo alphaherpesvirus, bem como a virulência deste agente, suas variantes e o estágio de vida e as taxas de mortalidade de *C. mydas* decorrentes da doença (JONES et al., 2016; DUFFY, MARTINDALE, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO, MANEJO E SELEÇÃO DAS TARTARUGAS

Amostras teciduais foram coletadas na base do projeto TAMAR-Ubatuba, uma vez que há estrutura de reabilitação permitindo a permanência dos animais na base antes da liberação e ao elevado número de animais capturados anualmente devido ao monitoramento existente nesta. No Brasil, no período de 2000 a 2005, 10.170 tartarugas-marinhas foram encontradas encalhadas, mortas ou vivas, sendo que 8.359 (82,2%) correspondem à tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) (BAPTISTOTTE, 2007). No estado de São Paulo de 2000 a 2014, a prevalência de fibropapilomatose foi de 10,43% (11.366) (BAPTISTOTTE, 2016).

Os animais são capturados incidentalmente em redes de pesca ou resgatadas de encalhes em praias do litoral de São Paulo e entregues às equipes especializadas do Projeto TAMAR, sendo encaminhados ao Centro de Reabilitação do Projeto na base de Ubatuba. A região caracteriza-se como área de alimentação de *C. mydas*, com alterações antrópicas em função do adensamento populacional ligado a moradias permanentes e população flutuante, tendo em vista o turismo na região (GALLO et al., 2006).

Desde 2000, foi inserido na base de dados do Projeto TAMAR a categoria “tumores”. Cada indivíduo capturado incidentalmente ou encalhado é analisado para detecção de tumores externos e segue o protocolo padronizado para coleta de amostras biológicas. Esse protocolo consiste no registro de dados como espécie, sexo (quando possível determinar), localização, biometria (comprimento curvilíneo da carapaça [CCC], massa corporal [MC]), número da marcação, condição geral (morta/viva) e condição corporal, entre outros. Os tumores são classificados de acordo com o tamanho, aspecto, formato, contorno e presença de ulceração (BAPTISTOTTE, 2016).

As tartarugas-verdes deste estudo foram capturadas ou resgatadas nos municípios de Ubatuba/SP (23°26’02” S, 45°04’16” W), em diferentes localidades de São Sebastião/SP (23°45’36” S, 45°24’35” W), Ilha Bela/SP (23º 46’ 41” S, 45º 21’ 29” W) e Caraguatatuba/SP (23º37’13” S, 45º24’47” W) situados no Litoral Norte do Estado de São Paulo, área costeira brasileira, onde há ocorrência de animais com e sem fibropapilomas. Dentre os indivíduos com FP, 3 foram procedentes de auto de

infração ambiental no Arquipélago de Alcatrazes, São Sebastião/SP, e encaminhadas para o Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres - LAPCOM, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP). Autorização SISBIO Nº 32636-7; 32636-9 e CEUA Nº 7501060717.

4.1.1 Obtenção das amostras de animais que vieram a óbito

Nos animais que vieram a óbito foram realizadas necropsias na base do Projeto TAMAR-Ubatuba e coletas amostras dos seguintes órgãos: gônadas, baço, fígado de *C. mydas* acometidas e não acometidas pela doença. Vinte e quatro dessas amostras foram provenientes do banco de tecidos armazenado no LAPCOM, onde já estavam disponíveis amostras de animais necropsiados em 2016. Destes, 10 eram tecidos de animais com FP e 14 de animais sem FP. Além desses, 3 animais com FP foram coletados em 2017 e mais 6 animais sem FP em 2018.

No total, no presente estudo 33 tartarugas-verdes foram analisadas para fígado, baço e gônadas, sendo 13 acometidas pela fibropapilomatose e 20 não acometidas pela doença. Dos animais não acometidos, 6 tiveram pele e pulmões também analisados.

Foi feita a utilização de material cirúrgico estéril (*punch* ou bisturi) individualizado para cada animal e para cada fragmento de órgão coletado. Os fragmentos retirados foram armazenados em microtubos contendo solução de álcool 70% e mantidos a -20ºC até chegarem ao Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres (LAPCOM), localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde foram mantidos a -80 ºC até o processamento.

4.1.2 Obtenção das amostras de animais vivos

Em animais vivos, amostras de sangue foram colhidas por punção do seio venoso cervical em tubos estéreis com anticoagulante EDTA e amostras de pele e tumor externo foram coletados através de biópsia com a utilização de material cirúrgico estéril (*punch* ou bisturi) individualizado para cada animal e para cada fragmento de pele e tumor coletado. A região a ser coletada foi previamente

higienizada com solução de iodopolvidine e fragmentos de até 0,5 cm foram retirados e armazenados em microtubos contendo solução de álcool 70% e mantidos a -20ºC até chegarem ao Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres (LAPCOM), localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde foram mantidos a -80 ºC até o processamento.

Foram analisadas 70 amostras ao todo, sendo 36 de animais com FP e 34 de animais sem FP. Destes, 50 foram coletados entre 2013 e 2016 apenas para sangue e estavam armazenados a -80 ºC no banco de tecidos do Grupo de Pesquisa sobre Fibropapilomatose em Tartarugas Marinhas, Universidade de São Paulo, enquanto 20 foram coletados para sangue, pele e tumor (quando presente) entre 2018 e 2019.

4.2 AVALIAÇÃO MOLECULAR

4.2.1 Preparação das amostras e extração de DNA

O processamento prévio das amostras para extração de DNA foi realizada no LAPCOM da FMVZ-USP. Para a extração de DNA dos tecidos foi utilizado o método com fenol-clorofórmio, estes foram submetidos à agitação em vórtex e a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido, a -80ºC, e descongelamento a 56°C. Uma alíquota de 100µL do sobrenadante foi submetida ao protocolo de extração de DNA.

Para a extração das amostras de sangue foi utilizado do Kit de extração de DNA Zymo Quick-gDNA Miniprep.

4.2.2 Extração de DNA

Em uma alíquota de 200µL do sobrenadante de cada amostra foi adicionado 500µL de solução de lise (SDS 1%; 100 mM EDTA pH 8.0; 20 mM Tris-HClph 8; água MilliQ) e 10 µL de Proteinase K. A solução foi homogeneizada em vórtex e incubada overnight a 37 °C em termobloco. Após incubação, 250µL de fenol e 250µL de clorofórmio foram adicionados em cada microtubo, seguido de homogeneização e centrifugação por 10 minutos a 12000 × g, a 4 °C para a separação das fases. Uma alíquota de 400 µL do sobrenadante foi transferida para outro tubo e adicionada 400µL de isopropanol. Esta solução foi incubada a -20 ºC por duas horas e em seguida foi centrifugada por 30 minutos a 12000× g a 4 °C, para precipitação do *pellet*.

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

Cada *pellet* obtido foi submetido a secagem em termobloco a 56 ºC, por 10 minutos, e o material obtido foi eluído em 50 µL de TE pH 8 (10mm Tris-HCl; 1mm EDTA), incubado por 10 minutos a 56 ºC e armazenado a -20 ºC até a realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR).

O DNA obtido foi quantificado em *Biotek Epoch Microplate Spectrophotometer* e somente amostras com mais de 0 µg/µL foram submetidas a Reação de PCR.

4.2.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Para a detecção dos genes da DNA polimerase, de proteínas de capsídeo, glicoproteínas e da serina-treonina quinase do genoma de ChHV5 foram utilizados os *primers* especificados na tabela a seguir:

Quadro 1: Sequência de *primers* e caracterização dos genes-alvo para ChHV5 utilizados.

Primers	**Gene-alvo**	**Sequência dos primers (5´-3´)**	**Tamanho do fragmento**	**Referência**
UL18	Proteína de capsídeo gene UL18	F: GTGGAACCCCGCCGGGTAAT R: TGATCCGGGCCGAGTAGCGG	140pb	Alfaro-Nunez; Gilbert, 2014
UL27	Glicoproteína B gene UL27	F: CTAGATACATACTGGCCRTGCTCGTC R: GCCAGCGACCATCCGGAG	143pb	Alfaro-Nunez; Gilbert, 2014
UL30	DNA polimerase de CFPHV	F: GACACGCAGGCCAAAAAGCGA R: AGCATCATCCAGGCCCACAA	~480pb	Quackenbush et al., 2001
F-US3B	Similar a uma serina/treonina quinase	F: GACACGCAGGCCAAAAAGCGA R: AGCATCATCCAGGCCCACAA	~700pb	Gattamorta, 2016

Fonte: Elaborado pela autora.

A amplificação de cada uma das sequências-alvo foi realizada conforme os seguintes protocolos: os genes UL18 e UL27, segundo Alfaro-Nunez et al., 2014, os genes da DNA polimerase, conforme Quackenbush et al., 2001 e os genes F-US3B de acordo com Gattamorta, 2016b.

Alfaro & Gilbert (2014) e Alfaro-Nunez e colaboradores (2016), em seus trabalhos já discutiam que metodologias que utilizam *primers* que amplificam sequências menores, como o UL18 (140 pb) e UL27 (143 pb), em comparação com

aquelas que utilizam *primers* que amplificam sequências maiores, como o UL30 (480 pb) e F-US3B (700 pb), demonstram maior sensibilidade para a detecção do ChHV5.

Uma amostra foi considerada positiva quando apresentou resultado positivo na detecção do agente viral para pelo menos um dos quatro genes avaliados.

4.2.4 Leitura e análise dos produtos da PCR

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal (25µL DNA amplificado acrescido de 2µL de corante *Gel Loading Buffer* em gel de agarose 2% (2 mg de Agarose Ultra-Pure; 100 ml TBE 0,5X [44,58 M Tris-Base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mm EDTA]) acrescido de tampão corrida TBE 0,5X pH 8 à 110V/50Ma. O gel foi corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* e visualizado com luz ultravioleta (UV) em câmara escura (Alphalmager). As amostras que revelaram bandas de DNA do tamanho do fragmento de cada gene e de acordo com o controle positivo foram consideradas positivas para a reação de PCR.

4.2.5 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos

Os produtos da PCR foram recortados do gel de agarose e purificados utilizando o Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Após a purificação, os produtos foram submetidos ao sequenciamento (Sanger), realizado por laboratório especializado.

4.2.6 Análises das sequências

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

estudo, foram submetidos ao sequenciamento os produtos da PCR detectados pelo primer correspondente a DNA polimerase do ChHV5 (UL30).

4.2.7 Análise filogenética

As sequências do gene estudado (DNA polimerase de ChHV5) foram alinhadas com sequências similares disponíveis no Genbank. A árvore filogenética foi elaborada com o programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2011), utilizando o Método de Agrupamento de Vizinhos, o modelo Jukes-Cantor e a confiabilidade dos ramos da árvore filogenética foi testada com 1000 repetições de bootstrap.

4.3 ANÁLISE DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA DO MAR

Para a determinação da qualidade da água do mar e sua correlação com os escores de tumor e condição corpórea dos animais, foram realizadas coletas de amostras de água dos pontos de captura dos animais. Para avaliar o grau de poluição das águas foram avaliados os seguintes parâmetros: Coliformes Termotolerantes, Bactérias Heterotróficas, pH, oxigênio dissolvido (OD), Carbono Orgânico Total, Nitrogênio amoniacal total, Nitrato, Nitrito e Polifosfatos. Foram realizadas duas coletas, uma em novembro de 2018 e outra em abril de 2019, nas praias de Camburi, Cedro e Barra Seca do município de Ubatuba.

As coletas e foram realizadas de acordo com os métodos preconizados na Resolução CONAMA 430/2011 (que alterou a Resolução CONAMA 357/2005), pela CETESB e pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater e as análises foram realizadas por laboratórios especializados. Os parâmetros selecionados foram escolhidos pela sua relação com a entrada de matéria orgânica de origem antrópica, particularmente esgoto sanitário, nos ambientes aquáticos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DADOS BIOMÉTRICOS E ESCORE DA FIBROPAPILOMATOSE

5.1.1 Animais necropsiados

Foram analisados 33 animais que vieram a óbito e passaram por necropsia na base do Projeto TAMAR-Ubatuba. Os animais amostrados neste estudo apresentavam um CCC (comprimento curvilíneo de carapaça) médio de 42,8 cm (± 6,71) com valor mínimo de 31,0 cm e máximo de 59,0 cm.

Dentre estas tartarugas analisadas, 87,88% (29/33) eram fêmeas e 12,12% (4/33) machos.

Nesta análise, a prevalência de animais com fibropapilomatose foi de 39,39% (13/33). De acordo com banco de dados do Projeto TAMAR apresentados no relatório National Oceanic and Atmospheric Administration - NOOA, a média de prevalência de *C. mydas* acometidas pela FP no estado de São Paulo no período de 2000 a 2014 foi de 10,43% (n=11366) (BAPTISTOTTE, 2016).

O monitoramento da fibropapilomatose em muitas regiões do mundo tem demonstrado comportamentos e prevalências variados da doença. No Brasil, a prevalência quando comparada às populações estudadas em outras áreas, apresenta frequências de baixas a moderadas (STACY, 2016).

Nos animais com FP, os tumores foram quantificados e classificados de acordo com o tamanho, segundo a proposta de Work & Balazs (1999): A (< 1cm), B (1cm ≤ FP ≤ 4cm), C (4cm < FP ≤10cm) e D (> 10cm), anotando-se a localização nas regiões anatômicas de acordo com SANCHEZ-SARMIENTO et al. (2012b).

A classificação de Work & Balazs (1999) foi utilizada para o cálculo de índice de fibropapilomatose (FPI) de acordo com ROSSI e colaboradores (2016b), utilizando a equação (1), onde N_X é o número de tumores de cada categoria de tamanho que foi quantificado em cada animal.

$$\mathbf{FPI = 0.1 \times N_A + 1 \times N_B + 20 \times N_C + 40 \times N_D} \qquad \mathbf{(1)}$$

Os resultados desta equação permitiram classificar o grau de severidade da doença ou escore da fibropapilomatose (FPS) em três grupos: (1) “leve” (FPI < 40), (2) “moderado” (40 ≤ FPI < 120) e (3) “severo” (FPI ≥ 120).

A seguir, é apresentado o número de tartarugas de acordo com sua condição corpórea e escore de FP (FPS) determinado através do FPI:

Tabela 1 - Número de tartarugas por condição corpórea e FPS

Condição corpórea\FPS	Leve	Moderado	Severo	Total
Bom	3	0	0	3
Regular	2	0	2	4
Ruim	5	1	0	6
Total	10	1	2	13

Fonte: Elaborado pela autora.
Nota: FPS, escore de fibropapilomatose.

Analisando os dados, de acordo com o que foi disposto a partir dos dados da Tabela 1, não foi possível encontrar uma relação direta entre a condição corporal e grau de severidade da FP, uma vez que 5 tartarugas classificadas com escore de FP leve apresentaram uma condição corpórea ruim. Estes achados estão de acordo com o trabalho de Rossi (2014).

Segundo o cálculo do índice de fibropapilomatose, 76,9% (10/13) dos animais apresentaram escore tumoral leve, 15,4% (2/13) tiveram escore severo, enquanto apenas 1 animal (7,7%, 1/13) foi classificado com grau moderado de FP. Os resultados estão de acordo com os dados analisados por Rossi e colaboradores (2016b). Baptistotte (2007) apresentou resultados semelhantes, tendo observado que as tartarugas-verdes encontradas no Brasil apresentam um grande número de pequenos tumores (categoria de tamanho A e B) enquanto no Havaí, encontram-se grandes tumores em menor quantidade, considerando o escore proposto por Work & Balazs (1999).

Estudos moleculares sugerem que o *Chelonid alphaherpesvirus-5* (ChHV5) é o agente etiológico da FP, demonstrando uma frequente associação da presença de DNA de ChHV5 em tecidos tumorais (LACHOVICH et al., 1999; LU et al., 2000; QUACKENBUSH et al., 2001; HERBST et al., 2004; ENE et al., 2005; DUARTE et al., 2012; PATRICIO et al., 2012; RODENBUSCH et al., 2014; GATTAMORTA, 2015; MONEZI et al., 2016; ZAMANA, 2018; DUFFY et al., 2018; DUFFY, MARTINDALE, 2019).

Os herpesvírus apresentam uma biologia complexa, em função de sua habilidade de estabelecer infecções latentes, geralmente assintomáticas, por um longo período de vida em seu hospedeiro. A latência é estabelecida em um conjunto específico de células que são normalmente não permissivas ou semi-permissivas ao

crescimento viral (STRAUSS, STRAUSS, 2008). Assim no presente trabalho, buscou-se fazer a detecção do ChHV5 em *C.* mydas com e sem FP mesmo em órgãos sem lesão, buscando assim compreender o processos de latência e dispersão viral nesses animais.

Foram realizadas avaliações moleculares de 32 amostras de gônadas, 33 de fígado e 32 de baço dos 33 espécimes deste estudo. Das tartarugas-verdes amostradas, 13 possuíam tumores cutâneos e 20 não apresentavam tumores. Nenhum dos órgãos analisados neste estudo apresentava tumores.

Para detectar a presença do vírus, foi realizada reação em cadeia pela polimerase (PCR) convencional sendo utilizados 4 genes, de acordo com Alfaro-Nunez & Gilbert (2014), Quackenbush et al. (2001) e Gattamorta, (2015). Uma amostra foi considerada positiva quando apresentou resultado positivo na detecção do agente viral para pelo menos um dos quatro genes avaliados.

De 20 animais sem tumores, 6 animais foram coletados em 2018 e analisados para pele, pulmões, gônadas, fígado e baço, e 14 animais já haviam sido previamente analisados para pele e pulmões (ZAMANA, 2018), sendo avaliados neste estudo, a presença do vírus em gônadas, fígado e baço.

A Tabela 2, apresenta o número de tecidos (tumor, pele, pulmões, gônadas, baço e fígado) onde ChHV5 foi detectado através de PCR convencional, por grau de severidade da doença (FPS) proposto por Rossi et al. (2016b):

Tabela 2 - Número de órgãos positivos para ChHV5 por FPS

FPS	Leve	Moderado	Severo
No. de órgãos positivos para ChHV5	3-6	4	6
No. de animais com FPS	10	1	2

Fonte: Elaborado pela autora.
Nota: No, número; FPS, escore de fibropapilomatose.

Para os 2 indivíduos com FPS severo, o número de tecidos onde ChHV5 foi detectado é maior (6). Estes resultados nos mostram que possivelmente em animais com escore de FP severo, a infecção por ChHV5 esteja disseminada, podendo ser detectado em uma maior número de tecidos. Para escore moderado, só temos um único indivíduo para analisar e para o escore leve, o número de tecidos com a detecção viral pode variar de 3 a 6.

É possível, que a não detecção do vírus em alguns órgãos tenha relação com uma baixa carga viral nestes tecidos que não apresentam lesões (QUACKENBUSH

et al., 2001; ALFARO-NUNEZ et al., 2016). Assim, novos estudos se fazem necessários para contribuir na elucidação da patogenia da doença. Além disso, o grau severo da doença apresenta maior probabilidade de disseminação do vírus no ambiente.

A Tabela 3 mostra o número de amostras positivas para o ChHV5 em baço, fígado e ovário por FPS. Não houve coleta de animais machos com FP, assim a análise para testículos não pode ser realizada.

Tabela 3 - Número de amostras de baço, fígado e gônada positivos para ChHV5 por FPS.

Órgãos\FPS	Leve	Moderado	Severo
Baço	7	0	2
Fígado	2	0	2
Ovário	8	1	2
Total	10	1	2

Fonte: Elaborado pela autora.
Nota: FPS, escore de fibropapilomatose.

Nos três graus de severidade de FP, nota-se a detecção molecular em ovário, sendo este um órgão importante para mais estudos relacionados à transmissão sexual e vertical de ChHV5 em tartarugas-marinhas.

5.1.2 Animais vivos

Foram analisados 70 amostras de sangue coletadas de animais vivos. Destes 50 foram coletados entre 2013 e 2016 e 20 entre 2018 e 2019. Os animais amostrados neste estudo apresentavam um CCC (comprimento curvilíneo de carapaça) médio de 41,3 cm (± 8,47) com valor mínimo de 29,0 cm e máximo de 84,0 cm, assim, todos os indivíduos amostrados foram classificados como juvenis.

A prevalência de animais com FP foi de 51,42% (36/70). Em 19 animais vivos acometidos pela FP coletados, foi anotado a condição corpórea (ruim, regular e bom) e seus tumores foram contados e classificados de acordo com Work & Balazs (1999) permitindo assim que fosse calculado o grau de severidade da doença segundo a equação (1).

A seguir, são apresentados os valores referentes as 19 tartarugas acometidas pela doença, amostradas neste estudo, de acordo com sua condição corpórea e escore de FP (FPS) determinado através do FPI:

Tabela 4 - Número de tartaruga por condição corpórea e FPS

Condição corpórea\FPS	Leve	Moderado	Severo	Total
Bom	8	3	3	14
Regular	3	1	1	5
Ruim	0	0	0	0
Total	11	4	4	19

Fonte: Elaborado pela autora.
Nota: FPS, escore de fibropapilomatose.

Analisando os dados apresentados na Tabela 4, assim como para animais necropsiados, não foi possível encontrar uma relação direta entre a condição corporal e grau de severidade da FP, achados que estão de acordo com os resultados de Rossi (2014).

Segundo o cálculo do índice de fibropapilomatose, 58% (11/19) dos animais apresentaram escore tumoral leve, 21% (4/19) escore moderado, 21% e (4/19) com escore severo de FP. Estes dados, assim como os dados apresentados na Tabela 1, estão de acordo com a literatura demonstrando que as tartarugas-verdes encontradas no Brasil apresentam um grande número de pequenos tumores (ROSSI et al., 2016b; BAPTISTOTTE, 2007).

A maioria dos herpesvírus estabelece uma infecção sistêmica pós-inoculação, acompanhada de um viremia associada às células, onde o vírus está presente no sangue. Em indivíduos infectados, a viremia é geralmente indicativa de replicação viral e pode ser detectada durante uma infecção primária ou durante a reativação do vírus após um período de latência (PAILLOT et al. 2008).

Assim, o presente estudou buscou detectar a presença de ChHV5 através de PCR convencional em sangue, pele e tumor de animais acometidos pela FP. Quatro genes alvo do vírus, com diferentes tamanhos (pb) foram utilizados, segundo o descrito na literatura, para permitir uma maior sensibilidade na detecção: Alfaro-Nunez & Gilbert (2014), Quackenbush et al. (2001) e Gattamorta (2015).

Uma amostra foi considerada positiva quando apresentou resultado positivo na detecção do agente viral para pelo menos um dos quatro genes avaliados.

A Tabela 5, apresenta o número de tecidos (tumor, pele e sangue) onde ChHV5 foi detectado através de PCR convencional, por grau de severidade da doença:

Tabela 5 - Número de tecidos positivos para ChHV5 por escore de FP (FPS)

FPS	Leve	Moderado	Severo
No. de tecidos positivos para ChHV5	2-3	0-2	3
No. de animais com FPS	6	2	1

Fonte: Elaborado pela autora.
Nota: No, número; FPS, escore de fibropapilomatose.

Para um único indivíduo com FPI severo, o número de tecidos onde ChHV5 foi detectado é maior (3), assim como aconteceu nos órgãos internos de animais necropsiados. Estes resultados nos mostram que possivelmente em animais com escore de FP severo, a infecção por ChHV5 esteja disseminada, podendo ser detectado em uma maior número de tecidos. Para escore moderado, 2 indivíduos foram analisados: 1 com dois tecidos positivos para o vírus e outro onde apenas pele e sangue foram coletados e considerados negativos. Nos 6 animais com escore leve, variou de 2 a 3 o número de tecidos onde se detectou o vírus.

A Tabela 6 mostra o número de amostras positivas para o ChHV5 em tumor, pele e sangue por grau de severidade da FP (FPS).

Tabela 6 - Número de amostras de tumor, pele e sague positivos para ChHV5 por FPS.

Tecidos\FPS	Leve	Moderado	Severo
Tumor	6	1	1
Pele	6	1	1
Sangue	1	0	1
Total	6	2	1

Fonte: Elaborado pela autora.
Nota: FPS, escore de fibropapilomatose.

Analisando-se os dados da Tabela 6, podemos observar que a detecção do vírus em sangue se deu tanto em animal com escore de FP leve como severo. Uma vez que a detecção de ChHV5 em sangue é um indicativo de viremia, podemos supor que a replicação viral independe da severidade desta doença. Já a detecção em pele e tumor é frequente nos 3 graus de FPI.

Os resultados apresentados reforçam evidências de diferenças da manifestação clínica da FP entre diferentes regiões geográficas. Tais diferenças podem ocorrer devido a diferentes variantes virais que podem apresentar diferentes graus de virulência, assim como diferenças na apresentação e severidade da doença (LAEGREID et al., 1993; KAA SHOEK et al., 1996; BERUMEN et al., 2001; ZHANG et al., 2001; YUNIS; JAROSINSKI; SCHAT, 2004). Além disso, fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento demográfico, às atividades industriais e

agronômicas próximas a regiões costeiras, baías e lagos podem contribuir para o desenvolvimento da doença (BALAZS, 1991; ADNYANA et al., 1997; FOLEY et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2010; VAN HOUTAN et al., 2010), visto que sua prevalência em ambientes marinhos antropizados é maior do que em indivíduos presentes em águas mais profundas e distantes da costa (HERBST, 1994; ADNYANA et al., 1997; FOLEY et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2010; VAN HOUTAN et al., 2010).

Trabalhos relatam que tartarugas com grandes quantidades de tumores cutâneos podem apresentar tumores internos, (BALAZS, 1998; WORK, BALAZS, 1999; AGUIRRE et al., 2001), assim era esperado que a detecção molecular do vírus também pudesse ser maior em animais onde o grau de severidade da doença é maior. Como avaliado na revisão da literatura, no Brasil, há poucos registros de tumores viscerais, talvez indicando uma diferença na manifestação da doença quando comparada com outros países. Essa caraterística, bem como, detecção molecular em orgãos não correspondente com o escore de FP, podendo ser resultado de diferentes variantes virais encontradas nas diferentes regiões geográficas (MORRISON et al., 2018) além de fatores ambientais (BALAZS, 1991; ADNYANA et al., 1997; VAN HOUTAN et al., 2010).

A avaliação das caraterísticas quantitativas e qualitativas é importante para uma melhor compreensão da patogênese da FP e fatores que modulam o desenvolvimento de tumores e seu impacto na saúde de cada individuo (ROSSI et al., 2016b). Novos estudos avaliando a carga viral em órgãos internos são necessários para elucidar a patogenia da doença. No caso de animais com grau severo de FP são necessários trabalhos avaliando se a disseminação do ChHV5 no ambiente é maior graças a estes indivíduos. Page-Karjian et al. (2015) através de qPCR demonstrou que a média de cópias de DNA viral na urina de animais com FP é maior do que em animais sem FP, sugerindo que animais com tumores podem disseminar quantidades relativamente maiores de DNA de ChHV5 na urina do que em animais sem tumores. Estudos desse tipo seriam interessantes para diferentes graus de severidade da doença.

5.2 DETECÇÃO MOLECULAR DE ChHV5 EM TECIDOS

Fibropapilomas podem se desenvolver na superfície de tartarugas-marinhas incluindo carapaça, plastrão e até córnea. Também podem ser encontrados internamente na cavidade oral, esôfago, coração pulmões, rins, fígado, baço, sistema gastrointestinal e músculo esquelético (ADNYANA et al., 1997; BALAZS et al., 1998; WORK et al., 2004), principalmente no Havaí.

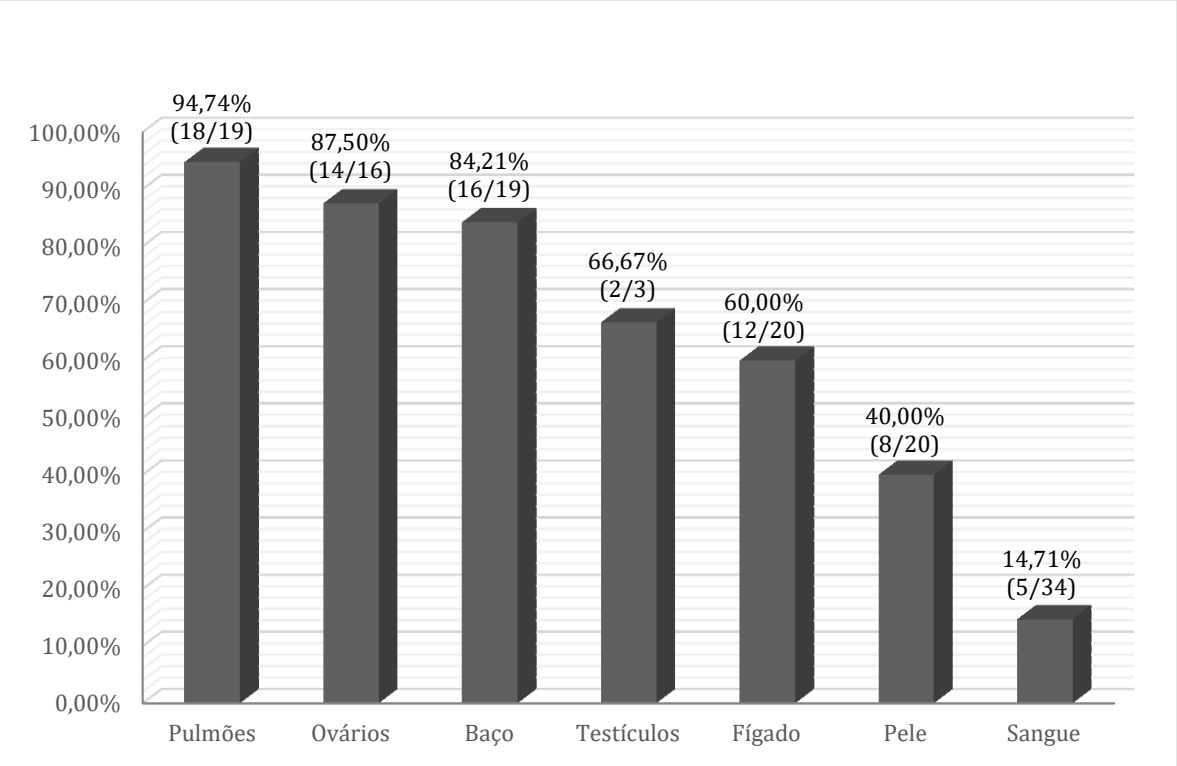
Os achados de fibromas e fibropapilomas em cavidade interna são pouco frequentes e estudados no Brasil. Os estudos destes animais, no Brasil, apontam para a presença de FP principalmente em nadadeiras (BALAZS et al., 1997; AGUIRRE et al., 1998; WORK et al., 2004; BAPTISTOTTE, 2007; SANTOS et al., 2010). No Brasil foram descritos em animais com tumores internos em pulmão e estômago no Estado do Pernambuco (BRITO et al., 2004), em coração e rins no litoral sul de São Paulo (DUTRA; NASCIMENTO; FUTEMA, 2012), na cavidade oral e esôfago no Estado do Espírito Santo (ROSSI et al., 2016) e em um pulmões, caracterizado como fibroma, em um indivíduo proveniente de Ubatuba/SP por Cruz-Ochoa (2017) e molecularmente analisado para ChHV5 por Zamana (2018). Recentemente Díaz-Delgado e colaboradores (2019), descreveram um sarcoma fibromixoide multicêntrico pulmonar de baixo grau com evidências moleculares de infecção por ChHV5 em uma tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriacea*).

A seguir são apresentados os resultados da detecção de ChHV5 em tecidos de *C. mydas* acometidas e não acometidas pela FP através da técnica de PCR convencional. Para a análise das amostras de sangue total foi utilizado o *primer* do gene da DNA polimerase (UL30), como encontrado nas análises feitas na literatura (LU et al., 2000; QUACKENBUSH et al., 2001; MONEZI et al., 2006; PAGE-KARJIAN et al., 2015). Nas amostras de tumor, pele, pulmões, gônadas, fígado e baço foram utilizados os *primers* UL30, UL18, UL27 e F-US3B, a fim de se obter uma maior sensibilidade na detecção do ChHV5. Além disso, foi realizada a análise para pele e pulmões de 6 animais coletados. Zamana (2018) realizou a análise das peles e pulmões dos outros 14 animais sem FP que tiveram gônadas, fígados e baços também analisados neste estudo.

Nos 34 animais vivos, sem FP analisados, 14,71% (5/34) das amostras de sangue foram positivas para ChHV5. Nos 20 animais sem FP necropsiados analisados, o vírus foi detectado em 84,21% (14/16) das amostras de ovários,

66,66% dos testículos (2/3), 84,21% (16/19) dos baços e 60,0% (12/20) dos fígados. Avaliando conjuntamente os resultados do presente estudo e do trabalho de Zamana (2018), temos de um total de 94,74% (18/19) de positivos para os pulmões e 40% (8/20) para as amostras de pele dos animais sem a doença. Os resultados obtidos neste estudo bem como os resultados da análise realizada por Zamana (2018) são apresentados nos gráficos a seguir:

Gráfico 1- Porcentagem de *C. mydas* positivas para ChHV5 por tecido (pele, pulmões, ovários, testículos, fígado, baço e sangue) de animais sem FP



Fonte: Elaborado pela autora.

Page-Karjian e colaboradores (2017) ao analisar 5 tartarugas sem fibropapilomatose, detectou o vírus apenas em coração, rins, nervo óptico e plexo braquial em animais da Florida. Lu e colaboradores (2000), não detectaram o ChHV5 em órgãos (pele, pulmões, rins, coração, baço, fígado, língua, nervo, cérebro, vesícula biliar, peritôneo e testículos) de animais sem fibropapilomatose das ilhas havaianas.

Segundo revisão bibliográfica aqui apresentada, detectamos apenas 2 trabalhos que descrevem a análise molecular de ChHV5 para órgãos de tartarugas-marinhas, Zamana (2018) e Días-Delgado et al (2019), sendo o último em tartaruga-de-couro. Os trabalhos no Brasil que descrevem tumores internos se basearam, em

sua grande maioria, em achados necroscópicos e avaliações histopatológicas (BRITO et al., 2004; DUTRA, NASCIMENTO, FUTEMA, 2012; ROSSI et al., 2016; CRUZ-OCHOA, 2017).

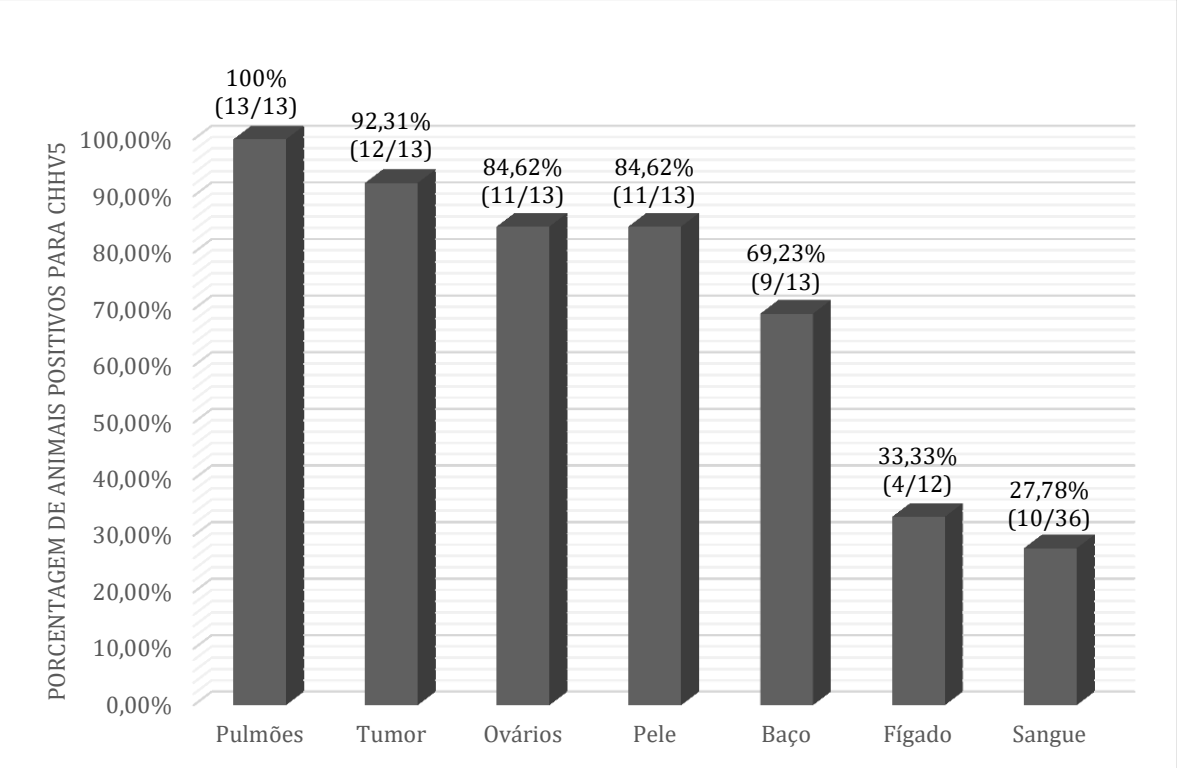
Em 2015, Page-Karjian e colaboradores utilizando ensaio molecular quantitativo (qPCR) com o gene alvo UL30, detectou o ChHV5 em amostras de sangue de animais dos EUA, que foram divididos em 3 grupos: A, com sinais clínicos de FP; B, com histórico de FP, mas sem sinais clínicos e C, sem histórico de FP. As análises foram realizadas em sangue total, detectando-se 33,3% (7/21), 46,2% (6/13) e 25,8% (8/31), e em amostras de plasma, o percentual de detecção foi de 9,5% (2/21), 7,7% (1/13) e 6,5% (2/31) dos grupos A, B e C respectivamente.

Lu et al. (2000) não detectaram ChHV5 em células mononucleares isoladas de sangue periférico de 3 animais com tumores através de nested PCR, assim como Quackenbush et al. (2001), através de qPCR. Em 2006, Monezi e colaboradores, através de nested PCR, detectaram a presença de ChHV5 em 25% (4/16) das amostras de sangue de animais com tumores de Ubatuba/SP. Para Page-Karjian et al. (2015), a presença do DNA viral em amostras de sangue, pode sugerir um mecanismo de transporte viral para a pele de sítios de infecção inicial ou latência (ou vice-versa).

O Gráfico 1 mostra que a detecção do ChHV5 em animais sem FP foi maior em pulmões, ovários, testículos, baço, fígado, pele e sangue.

No Gráfico 2, são apresentados os resultados da análise de animais com FP em amostras de sangue de 36 animais vivos e tumor, pele, ovários (só foram coletadas fêmeas com FP), baço e fígado de 13 animais necropsiados. Observamos que em animais com FP a detecção do vírus ocorreu em 100% (13/13) dos pulmões, seguido pelos tumores (92,31%, 12/13), ovários (84,62%, 11/13), pele (84,62%, 11/13), baço (69,23%, 11/13), fígado (30,77%, 4/13) e por último sangue (27,78%, 10/36).

Gráfico 2- Porcentagem de *C. mydas* positivas para ChHV5 por tecido (tumor, pele, pulmões, ovários, fígado, baço e sangue) de animais com FP



Fonte: Elaborado pela autora.

Vale ressaltar, que tanto animais sem ou com FP a detecção de ChHV5, como apresentado nos Gráficos 1 e 2, é maior nos pulmões (100% e 94,74%, respectivamente) seguido pelos ovários (87,5% e 84,62%), baço (69,23% e 84,21%), fígado (30,77% e 60%) e sangue (14,71% e 27,78%), mas difere em relação à detecção em pele, sendo maior em animais com FP (84,62%) do que em animais sem (40%). E apenas machos sem FP foram coletados e 66,67% dos testículos (2/3) foi positivo para o agente infeccioso.

Lu et al., (2000) usando nested PCR detectaram ChHV5 em 90% das amostras de pulmões, 47% em fígado e aproximadamente e 78% (7/9) dos ovários e 100% (3/3) dos testículos de animais com fibropapilomatose no Havaí. Quackenbush et al., (2001) fez a quantificação de ChHV5 através de Real-time PCR encontrando um baixo número de cópias de DNA (média de 0,0012 ± 0,0017 cópias por célula) em amostras de pulmão, fígado e gônadas (sem deixar claro se foram de machos ou fêmeas) de poucos animais (cerca de 10-20%) com fibropapilomatose do Havaí e Florida. Em 2017, Page-Karjian e colaboradores através de qPCR não detectaram o vírus nos órgãos amostrados no presente trabalho em tartarugas com FP da Florida.

Quackenbush e colaboradores (2001) discutiram sobre a associação do fígado e pulmões no desenvolvimento de tumores, sugerindo que a detecção do vírus, nesses órgãos, poderia indicar uma infecção inicial.

Lu et al. (2000) demonstraram uma prevalência de ChHV5 em pulmões de animais com tumores de 90% (17/19), que é muito próxima a encontrada neste estudo - 100% (13/13) em animais com a doença (Gráfico 2). No entanto, para indivíduos não acometidos Lu et al. (2000) e Page Karjian et al. (2017) não detectaram a presença do vírus, enquanto, a prevalência de ChHV5 em pulmões encontrada neste estudo foi de 94,74% (18/19) em indivíduos não acometidos (Gráfico 1).

Em tartarugas-marinhas, o ChHV5 foi detectado em swabs nasais, orais e oculares de indivíduos acometidos e não acometidos pela FP (GATTAMORTA, 2015; MONEZI et al. 2016; CHAVES et al., 2017), bem como em urina, swab cloacal e fezes (Page-Karjian et al. 2015; CHAVES et al., 2017; PAGE-KARJIAN et al., 2017). Estes dados sugerem potenciais vias de transmissão do vírus, como foi previamente sugerido (HERBST, KLEIN 1995; HERBST et al. 1996; WORK et al. 2004; PAGE-KARJIAN et al. 2015; MONEZI et al. 2016).

Em pele de tartarugas com e sem FP ChHV5 já foi detectado (QUACKENBUSH et al. 2001; ALFARO-NUNEZ et al., 2014; PAGE-KARJIAN et al. 2015; ALFARO-NUNEZ et al., 2016). Na presente análise, que inclui os resultados de Zamana (2018), o vírus foi detectado em 40% (8/20) das peles de animais não acometidos (Gráfico 1) e 84,62% (11/13) das amostras procedentes dos indivíduos acometidos pela FP (Gráfico 2). No período de 2012 a 2014, Gattamorta (2015) demonstrou em Ubatuba/SP a prevalência de ChHV5 em 37,03% (10/27) de pele de indivíduos com FP.

Segundo Quackenbush e colaboradores (2001), a presença de ChHV5 em pele de animais não acometidos pela FP representa um estágio inicial da infecção, sugerindo que estes indivíduos poderão desenvolver a doença. De fato, a detecção do vírus em pele para o presente estudo foi maior em animais que exibiam tumores cutâneos (84,61%) que animais sem tumores (40%). Em um estudo recente, Alfaro-Nunez et al. (2016) sugerem que a detecção de ChHV5 na pele de indivíduos que não apresentam tumores externos indica infecção latente, como observado em outros herpesvirus.

Em diferentes alphaherpesvirus foi demonstrada a presença do vírus em diferentes sítios anatômicos, sugerindo a persistência viral por infecção latente como em herpesvírus humano (CHEN, HUDNALL, 2006) e Equine herpesvirus 1 (EHV-1), que teve a presença detectada em pulmões, fígado e baço (MESQUITA et al., 2017a). Para ChHV5 Work et al. (2014), já haviam sugerido a latência em diferentes sítios anatômicos. Considerando estes estudos e os resultados encontrados, sugere-se que os pulmões, fígado, baço e gônadas podem ser locais de persistência do ChHV5 por infecção latente.

A constante detecção de ChHV5 em tumores evidencia a forte associação do ChHV5 com a doença, sugerindo este como o agente etiológico primário da FP, assim como descrito em demais estudos (HERBST et al. 1995, 1999; ENE et al. 2005; WORK et al. 2014; PAGE-KARJIAN et al., 2017; DUFFY, MARTINDALE, 2019). Por outro lado, a presença do agente em tecidos sem a manifestação de lesões pode estar relacionada ao comportamento dos alphaherpesvirus, indicando possíveis locais de persistência viral por infecção latente (ALFARO-NUNEZ et al., 2016; PAGE-KARJIAN et al., 2017).

Duffy et al. (2018) acreditam que a presença disseminada de ChHV5 em tartarugas não acometidas pela FP e em tecidos não tumorais possam indicar que o vírus possa ter tido seu potencial oncogênico ativado através de perturbações ambientais. Além disso, outros trabalhos baseados em reconstruções filogenéticas demostram que ChHV5 estava presente em tartarugas-marinhas, co-evoluiu com seu hospedeiro por milhões de anos, até divergirem evolutivamente e tornarem-se específicos destes animais, sendo o aparecimento dos tumores considerado um evento relativamente recente (HERBST et al., 2004; GREENBLATT et al., 2005; PATRÍCIO et al., 2012; ALFARO-NÚÑEZ, A. et al., 2014b; JONES et al., 2016; PAGE-KARJIAN et al., 2017).

No estudo de Morrison et al. (2018), foi sugerido que diferenças na manifestação clinica da FP está associada a diferentes variantes virais na região do Havaí e Florida. O mesmo fator pode explicar as diferenças na manifestação da doença, bem como a detecção do agente etiológico. Além disso, outro fator que deve ser considerado são as variações ambientais como temperatura, correntes marítimas, profundidade, luminosidade e pH que podem interferir na permanência de partículas virais viáveis no ambiente (CURRY et al., 2000), assim como fortes evidências sugerem que alterações ambientais localizadas induzidas pelo homem

são responsáveis por conferir potencial oncogênico a ChHV5 (FOLEY et al., 2005; VAN HOUTAN et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2010; JONES et al., 2016).

Os resultados demonstrados no presente trabalho fornecem dados da detecção do ChHV5 na região de Ubatuba/SP através da análise de diferentes tecidos de um mesmo indivíduo de *C. mydas* acometido e não acometido pela FP não descritos até o momento na literatura, contribuindo para estudos de detecção e prevalência deste agente na região. Entretanto, mais estudos buscando a detecção do ChHV5 em outros sítios anatômicos de um mesmo indivíduo se fazem necessários, assim como a quantificação da carga viral nos mesmos a fim de elucidar aspectos relacionados à patogênese da fibropapilomatose.

5.2.1 Detecção molecular de ChHV5 em gônadas de machos e fêmeas

No presente trabalho a prevalência de fêmeas foi maior do que de machos, sendo de 87,88% (29/33) e 12,12% (4/33) respectivamente. No entanto, um dos machos não teve os testículos coletados, então a análise molecular ocorreu em 29 ovários (90,63%) e 3 testículos (9,37%) de um total de 32 gônadas.

Uma vez que os herpesvirus são sabidamente transmitidos horizontalmente de um organismo infectado para o outro por contato físico direto via saliva, muco, sangue ou sêmen (DAVISON, 2002), presente estudo buscou detectar a presença de ChHV5 em tecidos reprodutivos a fim de avaliar uma possível participação da via reprodutiva na dispersão do ChHV5. Conforme se observa na Tabela 7, a porcentagem de detecção molecular de ChHV5 em gônadas foi maior em fêmeas (89,65%) do que em machos (66,66%).

Tabela 7 - Porcentagem de positivos e negativos para ChHV5 em gônadas de machos e fêmeas (n=32).

	Machos	**Fêmeas**	**Total**
Positivos ChHV5	66,66% (2/3)	89,65% (26/29)	87,50% (28/32)
Negativos ChHV5	33,34% (1/3)	10,35% (3/29)	12,50% (4/32)
Total	100%	100%	100%

Fonte: Elaborado pela autora.

No trabalho de Lu e colaboradores (2000), 9 fêmeas e 3 machos tiveram suas gônadas analisadas por nested PCR, com primer da região-alvo UL30, encontrando uma prevalência de 78% e 100% respectivamente em animais com FP. Um único

testículo de um animal sem FP foi analisado e considerado negativo para ChHV5. Contudo, a metodologia empregada foi diferente da utilizada no presente estudo.

A detecção de DNA deste herpesvírus em gônadas de tartarugas que não apresentam fibropapilomas pode indicar um possível tropismo do ChHV5 por esse tecido ou persistência do patógeno. Tais resultados podem também apontar para uma possível via de transmissão sexual ou vertical da infecção, como ocorre em outros herpesvirus como em bivalves portadores do herpesvírus OsHV-1 (ARZUL et al. 2002; SANMARTÍN et al. 2016).

Em seres humanos, infecções pelo herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1) ou tipo 2 (HSV-2) causam infecção genital, o que pode acarretar um risco de transmissão para o feto ou recém-nascido, bem como em herpesvírus humano 8 (HHV-8) (JAMES et al. 2014; PLANCOULAINE et al. 2000).

Recentemente um herpesvírus que infecta tartarugas, *Testudinid herpesviruses genotype*-3 (TeHV-3), também da família Alphaherpesvirinae, foi reportado com evidências de transmissão vertical (MARENZONI et al., 2018). Recentemente TeHV-3 foi classificado no mesmo gênero do ChHV5 (ICTV, 2019) o que pode indicar a existência de semelhanças na biologia desses dois agentes (MATEU, 2013).

A disseminação de herpesvírus pode ocorrer através da saliva, secreções, aerossóis, fezes, células infectadas, ou contato sexual, mas esta característica do vírus tem sido pouco estudada em ChHV5 (GATTAMORTA, 2016a; MONEZI et al. 2016; CHAVES et al., 2017). A detecção do ChHV5 em urina, swab cloacal e fezes (Page-Karjian et al. 2015; CHAVES et al., 2017; PAGE-KARJIAN et al., 2017) apontam a cloaca como uma possível via de disseminação do vírus.

Não há trabalhos sobre a transmissão sexual ou vertical de ChHV5 em tartarugas-marinhas na literatura, mas esta hipótese não pode ser descartada uma vez que ocorre em outros herpesvírus, inclusive da mesma família. Não há relatos de FP em recém-nascidos ou filhotes pós-pelágicos que chegaram recentemente em áreas de forrageamento (HERBST, 1994), contudo, segundo a revisão bibliográfica realizada para este estudo, até o momento não há trabalhos buscando a detecção do agente viral em ovos, natimortos ou filhotes de tartarugas-marinhas.

Uma possível transmissão sexual ou vertical de ChHV5 pode ter implicações importantes na prevalência de ChHV5 e da doença em populações de tartarugas-marinhas. Tendo em vista o caráter latente das infecções por herpesvírus, é possível

que mesmo filhotes sem manifestações clínicas possam ser portadores e assim, também serem dispersores deste vírus, contribuindo para a manutenção do ChHV5 no ambiente. Portanto, estudos avaliando essas possibilidades se fazem necessários para compreender o impacto que esta doença pode ter sobre as tartarugas-marinhas.

5.2.2 Detecção de ChHV5 com diferentes genes-alvos

5.2.2.1 Órgãos

Com o intuito de avaliar qual o melhor marcador molecular para a detecção de ChHV5 em gônadas, fígado e baço, assim como aumentar a sensibilidade da metodologia empregada, a análise através de PCR convencional neste estudo se baseou na utilização de 4 *primers* que amplificam sequências de tamanhos diferentes: UL18 (140 pb), UL27 (143 pb), UL30 (480 pb) e F-US3B (700 pb).

Alfaro & Gilbert (2014) e Alfaro-Nunez e colaboradores (2016), em seus trabalhos já discutiam que metodologias que utilizam *primers* que amplificam sequências menores em comparação com aquelas que utilizam *primers* que amplificam sequências maiores demonstram maior sensibilidade para a detecção do ChHV5. Porém, como se pode observar na Tabela 8, os nossos resultados apresentam uma maior detecção de ChHV5 através do *primer* de UL18, seguido pelo UL30 e UL27, enquanto o *primer* F-US3B não foi responsável por nenhum resultado positivo.

Tabela 8 - Número de positivos para cada gene-alvo de ChHV5 testado para gônadas, fígado e baço.

Tecido	UL30	UL18	UL27	F-US3B	No. total de amostras
Gônadas	20	24	5	0	32
Fígado	5	13	4	0	32
Baço	12	23	1	0	32

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Tabela 8 se observa que o *primer* UL18 foi responsável pelo o maior número de positivos tanto em gônadas (24), baço (23), como em fígado (13).

É interessante notar, nos dados exibidos na Tabela 8, que o *primer* UL27 apesar de ter poucos pares de base (143 pb), se mostrou pouco sensível na detecção do vírus nos órgãos. Este resultado difere do apontado por Alfaro-Nunez e

colaboradores (2016). Apenas para a detecção em amostras de fígado o gene UL27 foi relevante, uma vez que foi positivo para 3 indivíduos que não foram positivos para nenhum dos outros *primers* avaliados neste estudo (Tabela 10).

O UL27 é responsável pela produção de Glicoproteína B, proteína do envelope viral encontrada apenas em grandes quantidades em vírions intactos durante replicação lítica (ZHU et al., 2004). A baixa detecção deste gene pode nos apontar para variações de ChHV5 entre diferentes locais do mundo. De fato, autores encontraram diferenças em sequências de nucleotídeos do gene UL27 em amostras da Austrália e Havaí (MORRISON et al., 2018).

Ademais, Ackermann e colaboradores (2012), sequenciaram o genoma completo de ChHV5 através de clones de cromossomo artificial bacteriano (BAC), e encontraram quatro genes atípicos que possuem similaridades com herpesvirus das outras subfamílias (alphaherpesvirinae, beta e gammaherpesvirinae). Estes genes podem estar relacionados à replicação viral e à ação anti-apoptose, desempenhando funções na patogênese da formação de tumores ou na evasão do sistema imunológico. Essas evidências reforçam a hipótese de variações geográficas do agente e uma possível relação com a manifestação clínica da FP (MORRISON et al., 2018).

A elucidação dos mecanismos moleculares da patogênese, bem como o desenvolvimento de testes de diagnósticos e possíveis tratamentos poderiam ser facilitados pelo acesso a mais informações sobre a sequência gênica de ChHV5 (ACKERMANN et al., 2012) o que ainda não foi feito para tartarugas no Brasil.

5.2.2.2 Amostras de sangue

Na literatura a detecção de ChHV5 em sangue de tartarugas com (LU et al., 2000; QUACKENBUSH et al., 2001; PAGE-KARJIAN et al., 2015) e sem FP (PAGE-KARJIAN et al., 2015) foram realizados através de metodologias como qPCR e nested PCR, porém todos utilizaram o *primer* da DNA polimerase (UL30) do genoma de ChHV5.

Como citado anteriormente, estudos já apontaram que metodologias que utilizam *primers* que amplificam sequências menores demonstram maior sensibilidade do que aqueles que amplificam sequências maiores (ALFARO; GILBERT, 2014; ALFARO-NUNEZ et al., 2016). Assim, a fim de avaliar a utilização

de outros marcadores moleculares para a detecção de ChHV5 em sangue de *C. mydas*, o presente trabalho utilizou o PCR convencional com 4 *primers* que amplificam sequências de tamanhos diferentes: UL18 (140 pb), UL27 (143 pb), UL30 (480 pb) e F-US3B (700 pb). A Tabela 9 demonstra os resultados de PCR convencional para os diferentes genes-alvo de ChHV5 em 70 amostras de sangue de animais cometidos e não acometidos pela FP.

Tabela 9 - Porcentagem de animais positivos e negativos em animais acometidos e não acometidos pela FP para os *primers* UL30, UL18 e UL27 juntos e F-US3B que amplificam sequências de ChHV5 (n=70).

Primers de ChHV5	**FP +**	**FP -**	**Total**
UL30	27,78% (10/36)	14,70% (5/34)	21,43% (15/70)
UL18 e UL27	47,22% (17/36)	47,06% (16/34)	47,14% (33/70)
F-US3B	2,78% (1/36)	0% (0/34)	1,43% (1/70)
Detecção de ChHV5 nos 4 genes	55,56% (20/36)	47,06% (16/34)	51,43% (36/70)

Fonte: Elaborado pela autora.
Nota: FP+, animais acometidos pela fibropapilomatose e FP-, animais não acometidos pela fibropapilomatose.

Como mostra a Tabela 9, levando em consideração os resultados dos 4 *primers* em conjunto, 55,56% (20/36) dos animais com FP tiveram ChHV5 detectado em amostras de sangue. Nos animais sem FP, a porcentagem de detecção foi de 44,44% (16/36).

Assim como nos órgãos analisados neste estudo, a região UL18 do genoma viral foi responsável pela maior parte das detecções, tanto em animais com (47,22%, 17/36) como em animais sem FP (47,06%, 16/34), enquanto a região F-US3B foi responsável por apenas um (1) resultado positivo em um animal com FP. Os resultados de UL18 e UL27 são apresentados em conjunto na Tabela 9, uma vez que os mesmo animais que foram positivos para UL27 também foram para UL18 ou UL30 (Tabela 11), ademais a detecção da região UL27 por si só, foi responsável por uma baixa porcentagem de detecção do agente viral.

A porcentagem de detecção com UL30, no presente estudo foi de 27,78% (10/36) em animais acometidos pela FP e 14,70% (5/34) em animais não acometidos. Monezi et al., 2006 detectaram a presença de ChHV5 através de nested PCR em 25% (4/16) de animais acometidos na região de Ubatuba/SP. Page-Karjian et al. (2015) detectou o ChHV5 em amostras de sangue total de animais dos EUA, que foram divididos em 3 grupos: A, com sinais clínicos de FP com 33,3% (7/21) de animais positivos; B, com histórico de FP, mas sem sinais clínicos com 46,2% (6/13)

e C, sem histórico de FP com 25,8% (8/31) de detecção. Apesar da diferença entre as metodologias empregadas, os valores de detecção usando UL30 são semelhantes.

Para Page-Karjian et al. (2015), a presença do DNA viral em amostras de sangue, pode sugerir um mecanismo de transporte de ChHV5 para a pele a partir de sítios de infecção inicial ou latência (ou vice-versa). Os resultados positivos para animais sem tumores podem indicar uma infecção inicial ou subclínica (PAGE-KARJIAN et al., 2012; ALFARO-NUÑES et al., 2014; GATTAMORTA et al., 2017).

Tanto para animais necropsiados como para animais vivos o *primer* UL18, que tem como gene alvo uma proteína do capsídeo de ChHV5 (ALFARO; GILBERT, 2014), demonstrou a maior sensibilidade na detecção do agente viral (Tabelas 9 e 10), sendo assim um importante marcador molecular para determinação de indivíduos portadores do vírus. Chaves e colaboradores (2017) destacaram a necessidade técnicas moleculares sensíveis para permitir a detecção do DNA de ChHV5 em diferentes tecidos biológicos, favorecendo a detecção de infecções precoces.

5.2.3 Prevalência de ChHV5 em indivíduos acometidos e não acometidos pela fibropapilomatose

5.2.3.1 Animais necropsiados

A prevalência de ChHV5 neste trabalho para indivíduos de *C. mydas* necropsiados foi de 100% para animais com FP (13/13) e para animais sem FP (20/20). Estes resultados são obtidos ao se avaliar conjuntamente os resultados do presente estudo e do estudo de Zamana (2016) totalizando 6 tecidos analisados para animais acometidos (pele, pulmões, gônada, fígado, baço e tumor) e 5 tecidos analisados em animais não acometidos pela doença (pele, pulmões, gônada, fígado e baço) como demonstrado na Tabela 10. Neste estudo, um indivíduo foi considerado positivo para ChHV5 quando o mesmo foi detectado em ao menos um dos tecidos analisados.

Estes resultados demonstram como a utilização de um maior número de tecidos, bem como de mais genes alvos, aumenta a sensibilidade da detecção molecular para ChHV5. Os dados da Tabela 10, demonstram também, que a análise

de pulmões e gônadas já seriam suficientes para uma detecção molecular adequada de ChHV5, uma vez que, naqueles indivíduos onde os pulmões não foram positivos, as gônadas foram e vice-e-versa.

Tabela 10 - Relação de tecidos positivos e negativos para ChHV5 para animais com e sem FP (n=33).

	Amostra	Tumor	Pulmões	Gônadas	Pele	Baço	Fígado	No. total de tecidos positivos para ChHV5
Animais com FP	U33	P	P	P	P	P	P	6
	U46	P	P	P	P	P	P	6
	U1684	P	P	P	P	P	P	6
	U32	P	P	P	P	P	N	5
	U47	P	P	P	P	P	N	5
	U45	P	P	P	P	P	N	5
	U43	N	P	P	P	P	P	5
	AG1	P	P	P	P	N	N	4
	U30	P	P	P	P	N	N	4
	U44	P	P	P	N	P	SA	4
	U25	P	P	N	P	P	N	4
	AG2	P	P	N	P	N	N	3
	AG3	P	P	P	N	N	N	3
Animais sem FP	U22	-	P	P	P	P	P	5
	U26	-	P	P	P	P	P	5
	U28	-	P	P	P	P	P	5
	U29	-	P	P	N	P	P	4
	U48	-	P	P	N	P	P	4
	U49	-	P	P	N	P	P	4
	SN4	-	P	P	N	P	P	4
	U23	-	P	N	P	P	P	4
	SN3	-	P	N	P	P	P	4
	SN5	-	P	P	P	N	P	4
	SN6	-	P	P	P	N	P	4
	U41	-	P	P	N	N	P	3
	U42	-	P	P	N	N	P	3
	U50	-	P	P	N	N	P	3
	U24	-	P	N	N	P	P	3
	SN2	-	N	P	P	N	P	3
	SN1	-	P	P	N	P	SA	3
	U40	-	P	P	N	N	N	2
	U27	-	P	SA	N	N	P	2
	U38	-	SA	P	N	P	N	2

Fonte: Elaborado pela autora.
Nota: P, positivo para ChHV5; N, negativo para ChHV5; SA, sem amostra.

Em 2015, Gattamorta (2015) detectou ChHV5 em 74,51% (38/51) de tartarugas-verdes em Ubatuba/SP. Para determinação da prevalência, o autor também utilizou PCR qualitativo, com dois *primers* (UL30 e F-US3B) em amostras de pele e tumor. Por outro lado, o trabalho de Zamana através da mesma metodologia,

porém, fazendo uso de três *primers* (UL30, UL18 e F-US3B) em amostras de pele, tumor e pulmões, encontrou uma prevalência de 94,33% (50/53).

Se no presente estudo a análise por indivíduos fosse realizada considerando apenas os resultados de gônadas, fígado e baço a prevalência de ChHV5 diminuiria de 100% para 96,97% (32/33) do total de tartarugas analisadas, ou 92,3% (12/13) em tartarugas com FP e 100% (20/20) em tartarugas sem FP. Isso se deve ao fato de que apenas um indivíduo neste estudo não o considerado positivo para nenhum dos 4 genes utilizados (UL30, UL18, UL27 e F-US3B) nos 3 tecidos anteriormente citados.

Em seu trabalho, Herbst et al. (2008) sugeriram que a alta prevalência de infecções por ChHV5 em tartarugas aparentemente saudáveis sugere que os surtos de FP podem ser influenciados por fatores ambientais ou do hospedeiro que afetam a expressão da doença.

Essa grande detecção de ChHV5 em tartarugas-verdes sugere que estes indivíduos portadores contribuem para a manutenção do vírus na região, partindo do princípio de que, mesmo na ausência de lesões, pode ocorrer a eliminação do vírus um vez que o mesmo já foi detectado em *swabs* nasais, oculares e orais (GATTAMORTA, 2015; MONEZI et al., 2016; CHAVES et al., 2017), urina, swab cloacal e fezes (PAGE-KARJIAN et al. 2015; CHAVES et al., 2017; PAGE-KARJIAN et al., 2017) (PAGE-KARJIAN et al., 2017).

5.2.3.2 Animais vivos

A Tabela 11 exibe a relação de tecidos positivos para ChHV5 em animais vivos amostrado, através da análise de PCR qualitativo com os quatro *primers* já citados anteriormente. De um total de 20 tartarugas, das quais 9 (45%) apresentavam FP, foram coletadas amostras de sangue, pele e tumor para a determinação da prevalência de ChHV5 por indivíduo. Um indivíduo foi considerado positivo, quando o ChHV5 foi detectado em pelo menos um dos tecidos avaliados.

A prevalência de ChHV5 nos indivíduos avaliados neste estudo foi de 80% (16/20), correspondendo a 88,89% (8/9) dos indivíduos acometidos pela FP e 72,73% (8/11) dos não acometidos.

Os resultados presentes na Tabela 11 demonstram como análise molecular de ChHV5 em diferentes tecidos biológicos, bem como a utilização de *primers* que

amplificam sequências de diferentes tamanhos, favorece a detecção do agente viral, principalmente em animais não acometidos pela FP.

Tabela 11 - Relação de tecidos positivos e negativos para ChHV5 para animais com e sem FP (n=20).

	Amostra	Tumor	Pele	Sangue
Animais com FP	SF3	P	P	P
	SF4	P	P	P
	SF1	P	P	N
	SF2	P	P	N
	SF5	P	P	N
	SF7	P	P	N
	SF8	P	P	N
	SF9	P	P	N
	SF6	SA	N	N
Animais sem FP	SU6	-	P	P
	SU10	-	P	P
	SU7	-	P	N
	SU8	-	P	N
	SU11	-	P	N
	SU1	-	N	P
	SU2	-	N	P
	SU3	-	N	P
	SU5	-	N	P
	SU4	-	N	N
	SU9	-	N	N

Fonte: Elaborado pela autora.
Nota: P, positivo para ChHV5; N, negativo para ChHV5; SA, sem amostra.

A alta prevalência de indivíduos portadores do ChHV5, tanto em animais necropsiados (Tabela 10) como em animais vivos (Tabela 11) demonstrada neste estudo e no estudo de Zamana (2018), sustenta a hipótese de Alfaro-Nunez et al. (2016), de que o vírus é quase onipresente, independente das condições clínicas dos animais, e que apresenta características de latência.

A análise conjunta dos tecidos de *C. mydas* feita neste estudo utilizando também os resultados do trabalho de Zamana (2018) nos permite formular uma hipótese a cerca da patogenia do ChHV5: o agente viral, aparente infecta os indivíduos através do sistema respiratório, uma vez que foi encontrada uma alta detecção vírus em pulmões. Destes, através da corrente sanguínea, em sua fase lítica, o vírus é transportado para outros órgãos como fígado, baço, gônadas e pele, que é o principal tecido onde ocorre o desenvolvimento de lesões. A alta detecção do ChHV5 em gônadas, sugere outra via de disseminação do agente viral, através

de uma transmissão sexual ou vertical, ou seja, da fêmea para os filhotes, como previamente discutido.

Outro aspecto importante de infecções subclínicas pelo ChHV5, é o fator epidemiológico, uma vez que animais portadores agem como verdadeiros reservatórios do vírus, podendo constituir importantes fontes de disseminação viral através de uma população (HERBST et al., 2008), o que pode ser considerado um grande problema para conservação das tartarugas-marinhas (FLINT, 2013).

O presente estudo fornece dados para uma melhor compreensão da FP, possíveis vias de transmissão do ChHV5, bem como o acompanhamento da prevalência da doença, o que favorece os esforços na conservação e sobriviência das tartarugas-marinhas, como sugerido por Flint e colaboradores (2010).

5.2.4 Caracterização molecular do ChHV5

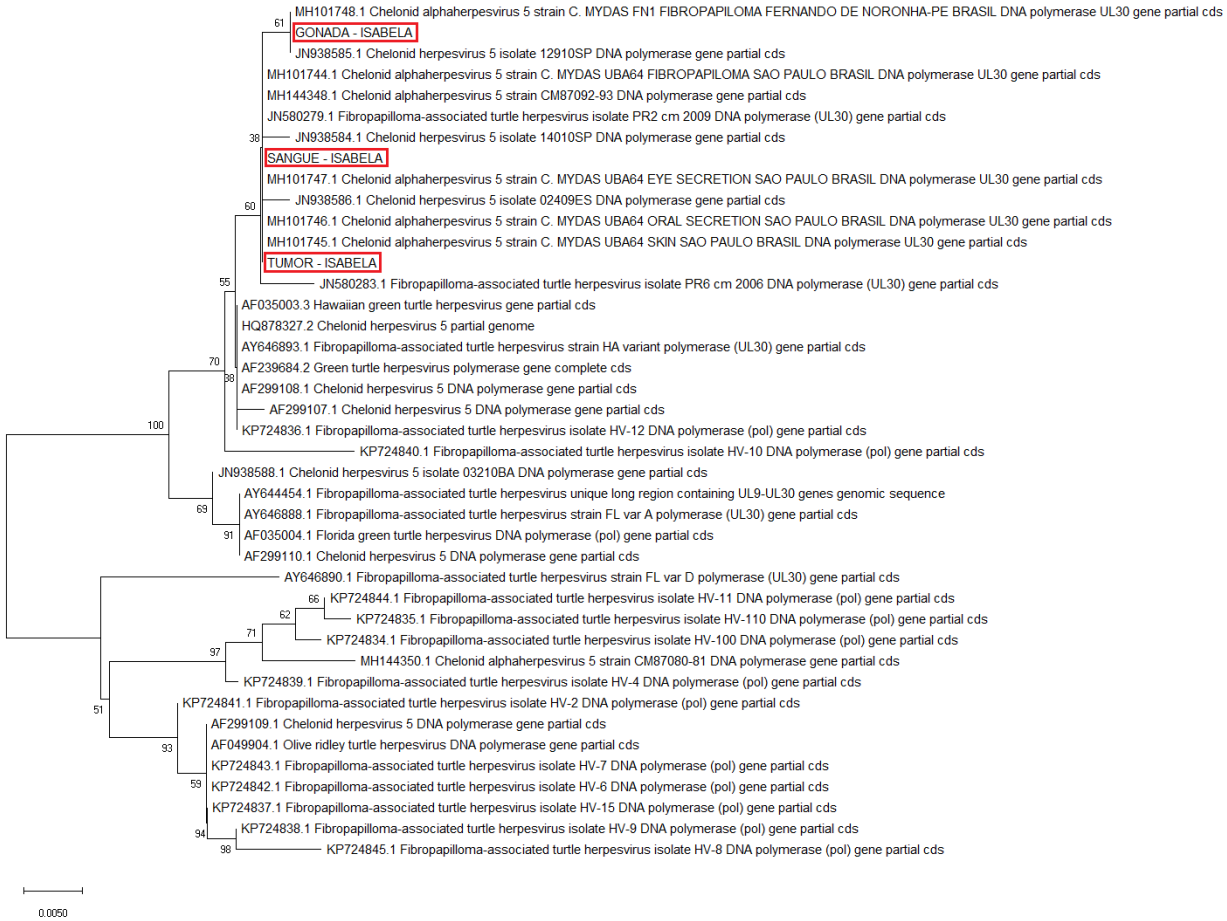
Produtos amplificados para a DNA polimerase de ChHV5 foram submetidos a sequenciamento em laboratório especializado. A Figura 3 demonstra as relações filogenéticas obtidas entre as sequências detectadas neste estudo, para amostras de sangue, tumor e ovário, àquelas provenientes de estudos anteriores.

A avaliação da identidade entre a sequência de sangue e tumor identificada neste estudo e àquelas disponíveis no Genbank, se baseou na análise de fragmentos do genoma parcial da DNA polimerase do ChHV5 (UL30). Foram analisados fragmentos de 423pb obtendo-se identidade de 100% com outras sequências provenientes de amostras de pele, tumor e secreções oral e ocular coletadas em Ubatuba/SP, (MH101745.1, MH144348.1, JN580279.1, MH101744.1, MH101747.1, MH101746.1) como se pode observar na Figura 3. Assim, é possível que a infecção desta variante viral tenha ocorrido nesta região (CHALOUPKA et al., 2008; ENE et al., 2005), uma vez que, nas áreas de alimentação ocorrem indivíduos de origens reprodutivas distintas que compartilham a mesma área por um longo período de tempo (NAROMACIEL et al., 2007).

Esses resultados demonstram que as sequências previamente descritas em pele, tecidos tumorais e secreções, também estão presentes em sangue. Portanto, um mesmo haplótipo do agente viral é capaz de infectar diferentes tecidos, o que é descrito em demais infecções por alphaherpesvirus (MESQUITA et al., 2017a; ZAMANA, 2018). Esta constatação reforça a hipótese de Page-Karjian et al. (2015)

que a presença do DNA viral em amostras de sangue, sugere um mecanismo de transporte de ChHV5 de outros sítios de infecção.

Figura 3 - Análise filogenética de sequências de 423 pb da DNA polimerase de ChHV5 em gônadas, sangue e tumor de *Chelonia mydas* de Ubatuba-São Paulo. A árvore foi gerada pelo método de Neighbor-joining, modelo Kamura 3-parâmetros, com 1000 repetições de bootstrap. Em vermelho, as sequências obtidas neste estudo.



Fonte: Elaborado para neste estudo.

A análise da Figura 3, nos leva a outra constatação importante: a sequência da DNA polimerase de ChHV5 em amostras de ovário foi próxima a uma sequência proveniente de amostras de Fernando de Noronha-PE (GATTAMORTA, 2016) e outra do Estado de São Paulo (RODENBUSCH, 2012). Assim, essas sequências apontam que os animais encontrados no Litoral Norte de São Paulo podem estar infectados por mais de um haplótipo viral como já descrito por Rodenbusch (2012).

Ademais, estes resultados indicam que os vírus podem ser transportados pelos animais durante suas rotas migratórias em áreas mais distantes, hipótese plausível com a característica latente dos herpesvírus (GATTAMORTA, 2016). Esta

análise nos leva novamente a ponderar sobre os fatores que levam o ChHV5 causar manifestações clinicas da fibropapilomatose. As mudanças no ambiente ou fatores ecológicos que afetam a transmissão do vírus ou da expressão da doença poderiam explicar o aumento da prevalência da doença (ENE et al., 2005).

Uma vez que a sequência encontrada no ovário é compatível com a sequência encontrada em Fernando de Noronha/PE por Gattamorta (2016), e que esta região é uma das principais áreas de desova da tartaruga-verde (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011a), pode-se supor que este seja mais um indício de transmissão vertical em ChHV5. Análises com ovos e filhotes são necessárias para testar esta hipótese, contudo, se sabe que este tipo de transmissão (mãe para prole) ocorre em outras infecções por herpesvirus como em OsHV-1 em bivalves, HSV (tipos 1 e 2) e HHV-8 em humanos e TeHV-3 em tartarugas. O TeHV-3 é um alphaherpesvirus pertencente ao mesmo gênero que ChHV5 (*Scutavirus*), o que reforça a possibilidade de que essa característica seja compartilhada entre estes dois vírus (MARENZONI et al., 2018; ICTV, 2019; MATEU, 2013).

5.3 DADOS DE QUALIDADE DA ÁGUA DAS PRAIAS DE UBATUBA

A forma como o ChHV5 é transmitido entre os indivíduos ainda é pouco conhecida. Fatores ambientais, como temperatura, correntes marítimas, profundidade, luminosidade e pH também podem interferir na permanência de partículas virais viáveis no ambiente (CURRY et al., 2000). A presença de compostos orgânicos e *debris* celulares podem estabilizar o vírus e aumentar sua sobrevivência (CLARK et al., 1998). Um estudo mostrou que um herpesvirus relacionado a tartarugas-marinhas, manteve sua infectividade na água do mar por até 120h (CURRY et al., 2000).

Existe uma série de evidências que aponta para a infecção por ChHV5 nas áreas de alimentação: uma maior densidade de indivíduos nestas áreas e a possibilidade de contato entre estes indivíduos e variantes regionais do herpesvírus comuns aos animais de cada uma destas áreas ou regiões (RODENBUSCH et al., 2014; ENE et al., 2005; 2004; QUACKENBUSH et al., 1998; GATTAMORTA et al., 2017). Como muitos dos indivíduos de *C. mydas* podem entrar em contato pela primeira vez com o ChHV5 nestas áreas, ou ainda pelo fato de que estas alterações ambientais possam comprometer a imunidade do hospedeiro, favorecendo o desenvolvimento de doenças, é importante detectar quais são as possíveis vias de disseminação e infecção do agente viral. Além disso, há uma forte preocupação com a conservação da espécie e a relação entre o vírus, sua forma de transmissão, as taxas de mortalidade em decorrência da FP e a reposição das populações ao longo do tempo.

Alguns autores já associaram a FP com o tempo de exposição das tartarugas-marinhas aos poluentes para o desenvolvimento de tumores (ADNYANA et al, 1997; CHALOUPKA, BALAZS, 2005). Logo, as áreas de alimentação apresentam elevada importância em estudos para o controle da qualidade da água, particularmente por permitirem compreender a relação entre o vírus e as tartarugas-marinhas, representarem locais em que há diversidade genética e estarem associadas à reposição de indivíduos adultos reprodutivos para as populações das espécies (CARRERAS et al., 2007).

Diversas áreas de alimentação de tartarugas-marinhas ao longo do globo encontram-se bastante impactadas pelas atividades humanas, seja pelas alterações físicas do habitat e de uso do solo, seja pelo lançamento de efluentes sanitários e

industriais a que os animais estão sujeitos durante a permanência nestas áreas (BALAZS, 1991; HERBST, KLEIN, 1995; ADNYANA et al., 1997; VAN HOUTAN et al., 2010). Este é o caso da região de Ubatuba-SP que é particularmente sujeita a lançamento de efluentes sanitários sem tratamento prévio, reconhecida como uma importante área de alimentação e refúgio de tartarugas-verdes no Atlântico Sul (GALLO et al., 2006).

O município de Ubatuba possui uma das duas bases do Projeto TAMAR em áreas exclusivamente de alimentação, sendo a única base presente no Sudeste Brasileiro, monitorando assim as tartarugas-marinhas de toda a microrregião do Litoral Norte do Estado de São Paulo.

O município de Ubatuba possui uma população residente estimada em 89.747 habitantes (IBGE, 2018), mas esta população pode aumentar significativamente em feriados e no verão. Apenas 39% do esgoto da região de Ubatuba é coletado pelo sistema de esgoto sanitário e 100% deste é tratado antes do lançamento em corpos d'água na cidade (SÃO PAULO, 2018). No entanto, outros 61% não apresentam tratamento ou possuem soluções individuais de tratamento, como fossa séptica e negra e o que não é tratado pode efetivamente ser lançado *in natura* e, consequentemente, chegar à região litorânea. O sistema de esgoto fica restrito à área central. E as Associações de Amigos de Bairro também têm encontrado alternativas para o tratamento de esgoto, a exemplo da Praia Grande, formada pela COAMBIENTAL (Cooperativa de Saneamento Ambiental da Praia Grande) (JORGE, 2004).

Das 78 praias do município de Ubatuba, 24 são monitoradas pela CETESB semanalmente, conforme critérios definidos pela resolução CONAMA 274/2000. Utilizando-se a classificação da OMS, que associa a concentração de enterococos ao risco de se contrair doenças, pode-se observar que 85% das praias deste município estiveram nas categorias A e B, em 2017, apresentando qualidade Muito Boa e Boa. Em 2016, 77% das praias foram classificadas nas categorias A e B, o que indica melhora na qualidade das praias, de acordo com esta classificação (SÃO PAULO, 2017).

Na base de dados do Projeto TAMAR cada indivíduo capturado incidentalmente, encontrado encalhado ou boiando possui uma ficha onde consta dados como espécie, sexo, localização, biometria, número da marcação entre outros (BAPTISTOTTE, 2016). De acordo com estes dados, as tartarugas-verdes deste

estudo foram capturadas ou resgatadas nos municípios de Ubatuba/SP (84), São Sebastião/SP (8), Ilha Bela/SP (4), Caraguatatuba/SP (3), Paraty/RJ (2) e Angra dos Reis/RJ (1). A Figura 4 mostra as praias do município de Ubatuba onde foram coletadas 40 tartarugas-verdes acometidas e 44 não acometidas pela FP para este estudo. Em apenas um indivíduo, sendo este não acometido pela FP, não foi registrado o dado referente à localidade deste animal.

Figura 4 - Demarcação das praias onde os indivíduos de *Chelonia mydas* estudados foram encontrados.

Fonte: Elaborado pela autora para este estudo.

Este estudo avaliou 102 *C. mydas*, sendo que 33 destes animais foram necropsiados e analisados para a presença de ChHV5 através de PCR convencional em tumor (quando presente), pele, pulmões, fígado, baço e gônadas, 49 animais vivos analisados para sangue e 20 animais vivos analisados para tumor (quando presente), pele e sangue.

Das 25 praias do município de Ubatuba onde os animais deste estudo foram coletados (Tabela 12), 12 são praias monitoradas pela CETESB: Picinguaba, Lagoinha, Lázaro, Perequê-açu, Enseada, Toninhas, Itaguá, Grande, Vermelha do Sul, Vermelha do Centro, Itamambuca e Tenório.

Tabela 12- Número de tartarugaw0s com e sem FP e animais positivos para análise molecular de ChHV5 por ponto de coleta.

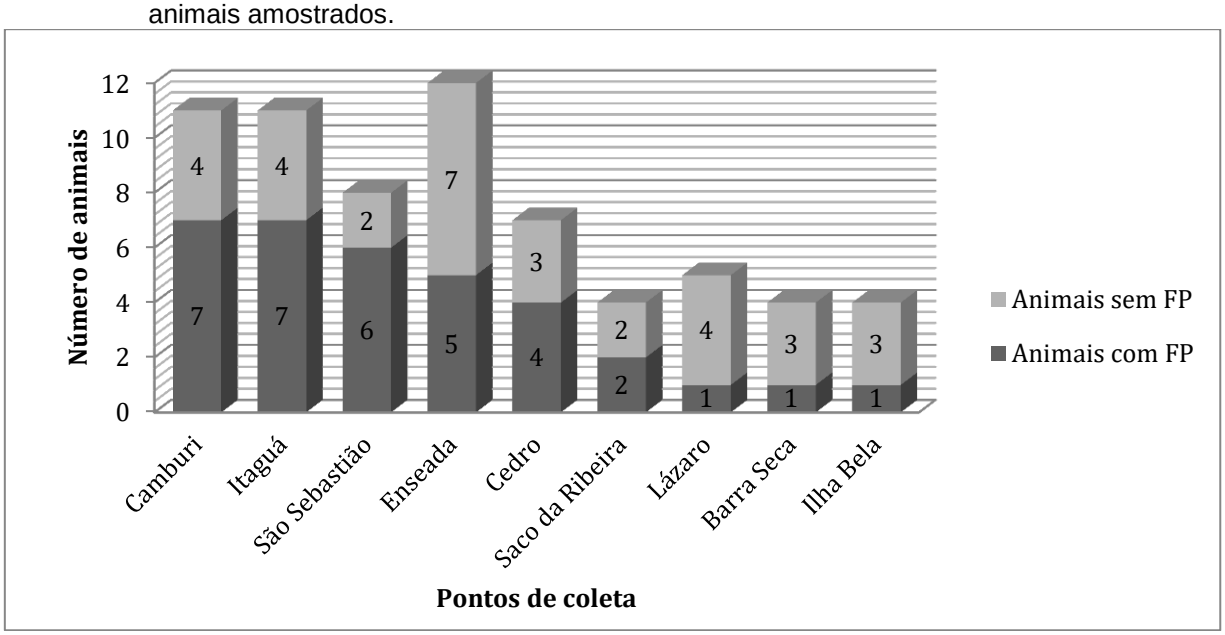
	Praias	Com FP			Sem FP			Total
		No. total	ChHV5 +	% ChHV5+	No. total	ChHV5 +	% ChHV5+	
Praias do município de Ubatuba	Itaguá	7	7	100,0%	4	2	50,0%	11
	Camburi	7	5	71,4%	4	3	75,0%	11
	Enseada	5	3	60,0%	7	5	71,4%	12
	Cedro	4	4	100,0%	3	3	100,0%	7
	Almada	3	2	66,7%	0	0	0,0%	3
	Saco da Ribeira	2	2	100,0%	2	2	100,0%	4
	Lázaro	1	1	100,0%	4	3	100,0%	5
	Barra Seca	1	1	100,0%	3	3	100,0%	4
	Picinguaba	1	1	100,0%	1	1	100,0%	2
	Vermelha do Sul	1	1	100,0%	1	1	100,0%	2
	Itamambuca	1	0	0,0%	1	1	100,0%	2
	Bonete	1	0	0,0%	1	0	0,0%	2
	Estaleiro	1	1	100,0%	0	0	0,0%	1
	Peres	1	1	100,0%	0	0	0,0%	1
	Matarazzo	1	1	100,0%	0	0	0,0%	1
	Tenório	1	1	100,0%	0	0	0,0%	1
	Praia do Léo	1	1	100,0%	0	0	0,0%	1
	Cruzeiro	1	0	0,0%	0	0	0,0%	1
	Perequê-açu	0	0	0,0%	4	3	75,0%	4
	Toninhas	0	0	0,0%	2	2	100,0%	2
	Lagoinha	0	0	0,0%	2	1	50,0%	2
	Vermelha do Centro	0	0	0,0%	2	0	0,0%	2
	Ilha do Mar Virado	0	0	0,0%	1	1	100,0%	1
	Praia Grande	0	0	0,0%	1	1	100,0%	1
	Ponta Aguda	0	0	0,0%	1	1	100,0%	1
Outros municípios	São Sebastião	6	5	83,3%	2	2	100,0%	8
	Ilha Bela	1	1	100,0%	3	3	100,0%	4
	Caraguatatuba	0	0	0,0%	3	2	66,7%	3
	Paraty	1	0	0,0%	1	1	100,0%	2
	Angra dos Reis	1	1	100,0%	0	0	0,0%	1
	Total	49	39	79,6%	53	41	77,4%	102

Fonte: Elaborado pela autora.
Nota: No. total, número total de animais coletados para cada ponto; ChHV5+, animais positivos para ChHV5.

Como se pode ver na Tabela 12, dentre todos os pontos de coleta, as praias de Enseada e Itaguá têm maior número de animais amostrados neste trabalho (12 e 11, respectivamente).

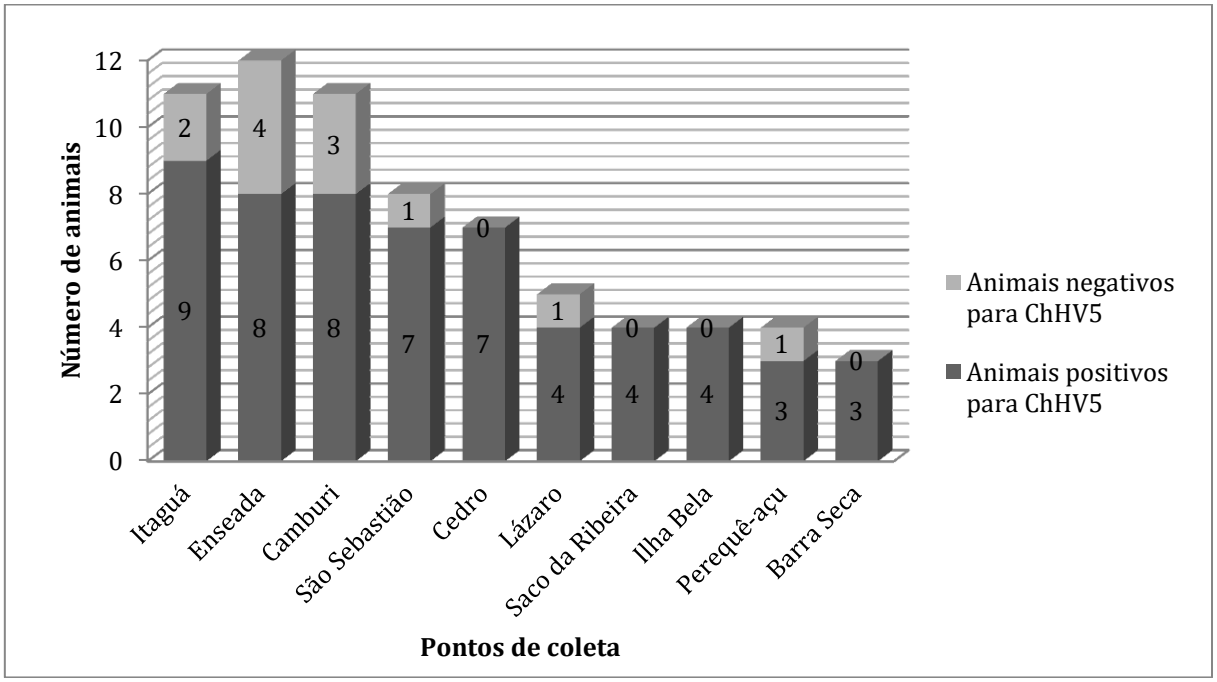
Os Gráfico 3 e 4 mostram a relação entre animais com e sem FP e animais negativos e positivos para ChHV5, respectivamente, nos pontos onde houve maior número de animais coletados. Em relação aos animais com FP, as praias com maior número de tartarugas foi Itaguá e Camburi, com 7 em cada (Gráfico 3). A praia de Itaguá é também aquela com maior prevalência de animais positivos para ChHV5 (9), seguida por Camburi (8) e Enseada (8) (Gráfico 4).

Gráfico 3 – Número de animais com e sem FP nos pontos de coleta onde houve maior número de animais amostrados.



Fonte: Elaborado pela autora para este estudo.

Gráfico 4 – Número de animais positivos e negativos para ChHV5 nos pontos de coleta onde houve maior número de animais amostrados.



Fonte: Elaborado pela autora para este estudo.

A análise dos Gráficos 3 e 4 evidenciam que as praias com maior número de animais acometidos pela doença também são as praias com maior número de animais positivos para ChHV5. Ademais, o número de animais positivos para ChHV5 é maior do que os animais acometidos pela FP, uma vez que o vírus pode ser detectado mesmo em animais sem a doença, como já discutido previamente.

Atualmente, as 3 praias de onde provém um maior número de tartarugas para o Projeto TAMAR de Ubatuba são: Camburi, Cedro e Barra Seca. Nestas praias há presença de pescadores parceiros do projeto, que mantém redes de pesca e frequentemente capturam incidentalmente tartarugas-marinhas. Quando tartarugas ficam presas nas redes de pesca, os pescadores entram em contato com o TAMAR para a entrega desses animais.

Essas 3 praias não são monitoradas pela CETESB, assim, delas foram coletadas amostras de água do mar para análise de Nitrato, Nitrito, Polifosfatos, Nitrogênio Amoniacal, Carbono Orgânico Total (COT), pH, Oxigênio Dissolvido (OD), Coliformes Termotolerantes e Bactérias Heterotróficas. Duas coletas foram realizadas: uma em novembro de 2018 e outra em abril de 2019.

A Tabela 13 traz os resultados de parâmetros físico-químicos para as duas análises das praias:

Tabela 13 - Parâmetros físico-químicos analisados para 3 praias de Ubatuba, coletas realizadas em novembro de 2018 e abril de 2019.

Praia	Coleta	Nitrato[1]	Nitrito[2]	Nitrogênio Amoniacal[3]	COT.[4]	Polifosfatos[5]	OD.[6]	pH	Cond.[7]	T.(ºC)[8]
Camburi	1	<0,20	<0,006	<0,10	<3,00	<0,02	7,2	7,1	50,4	22,3
	2	<0,20	<0,006	<0,10	<3,00	<0,02	9,2	7,4	48,1	27,5
Cedro	1	0,78	<0,006	<0,10	<3,00	<0,02	6,3	7,8	51,7	22,3
	2	<0,20	<0,006	<0,10	<3,00	<0,02	6,9	7,2	48,7	27,4
Barra Seca	1	0,24	0,007	<0,10	<3,00	0,02	8,9	7,1	46,8	21,2
	2	0,34	<0,006	<0,10	<3,00	<0,02	7,8	6,9	49,0	28,2

Fonte: Elaborado pela autora.
Nota: [1], Nitrato (mg/L NO^3-N); [2], Nitrito (mg/L NO^2-N); [3], Nitrogênio Amoniacal (mg N-NH3/L); COT[4], Carbono Orgânico Total (mg/L C); [5], Polifosfatos (mg P/L); OD[6], Oxigênio Dissolvido (mg/L); Cond.[7], Condutividade (mS/cm); T.[8], Temperatura (ºC).

Segundo a Resolução CONAMA 430/2011 (que alterou a Resolução CONAMA 357/2005), as água salinas são classificadas em função dos “usos preponderantes”, logo as praias podem ser consideradas:

> Seção II, Art. 5º, II - classe 1: aguas que podem ser destinadas: a) recreação de contato primário, conforme Resolução CONAMA nº 274, de 2000; b) a proteção das comunidades aquáticas; e c) a aquicultura e a atividade de pesca.

Essa resolução também dispõe sobre condições e padrões para a qualidade da água, entre eles, os valores de Nitrito, Nitrato, Nitrogênio Amoniacal, Polifosfatos

COT, pH, OD. Derivados de nitrogênio e fosfato normalmente apresentam-se em pequena quantidade nos corpos d'água. Quantidades grandes destes compostos podem ser provenientes da utilização de adubos e/ou despejo do esgoto doméstico ou industrial. Os valores de OD e pH são indicadores da presença de matéria orgânica em decomposição, uma vez que, em ambientes que recebam grande quantidade de matéria orgânica ocorre a diminuição do oxigênio dissolvido, pois as bactérias que dissolvem essa matéria consomem o oxigênio e alteram o pH da água que normalmente natureza está entre 6 e 9,5, ou seja, mais próximo de neutro (SOS MATA ATLÂNTICA, 2016). O COT é uma medida do teor de matéria orgânica nos corpos d'água superficiais é um importante indicador de poluição, pois sua presença implica no consumo do oxigênio dissolvido pelos microrganismos em seus processos metabólicos, o que tende a restringir outras espécies aquáticas (VON SPERLING, 2005).

Como se pode ver na Tabela 13, dos valores estabelecidos, o ensaio para Nitrato de uma das análises na praia do Cedro apresentou um valor em desacordo com o estabelecido para águas salinas classe 1, com valor de 0,78 mg/L NO_3-N (Limite: 0,40 mg/L NO_3-N).

A Tabela 14 exibe o resultado da análise microbiológica das duas coletas das praias de Camburi, Cedro e Barra Seca.

Tabela 14 - Parâmetros microbiológicos analisados para 3 praias de Ubatuba, coletas realizadas em novembro de 2018 e abril de 2019.

Praia	Coleta	Bactérias Heterotróficas (UFC/mL)	Coliformes Termotolerantes (UFC/100mL)
Camburi	Novembro de 2018	1	ausente
	Abril de 2019	22	>200,0
Cedro	Novembro de 2018	<1	ausente
	Abril de 2019	6	ausente
Barra Seca	Novembro de 2018	8	ausente
	Abril de 2019	200	>200,0

Fonte: Elaborado pela autora.

A Resolução CONAMA nº 274 de 2000, determina que as águas destinadas a recreação de contato primário (quando existir o contato direto do usuário com os corpos de água como, por exemplo, as atividades de natação, esqui aquático e mergulho) serão consideradas próprias quando nestas "houver, no máximo, 250 coliformes fecais (termotolerantes) ou 200 *Escherichia coli* ou 25 enterococos por l00 mililitros". Os coliformes termotolerantes ou termoresistentes (fecais) são

encontradas nas fezes de animais de sangue quente, inclusive dos seres humanos. São potencialmente patogênicos e sua presença pode ser uma evidência de despejo de esgoto (FUNASA, 2013; SOS MATA ATLÂNTICA, 2016).

A Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (Portaria de Potabilidade) determina que na água para consumo humano seja verificada a ausência de coliformes totais e *Escherichia coli* e determinada a contagem de bactérias heterotróficas, para garantir sua potabilidade. A mesma portaria estabelece que a contagem de bactérias heterotróficas deva ser realizada como um dos parâmetros para avaliar a integridade do sistema de distribuição de água (reservatório e rede), recomendando que não deva exceder a 500 Unidades Formadoras de Colônias por 1 mililitro de amostra (500 UFC/mL).

Sabe-se que insultos biológicos e químicos de caráter antropogênico (LUTCAVAGE et al., 1997) podem acarretar comprometimento da fisiologia, função imune, estresse crônico, além do aumento na suscetibilidade a doenças em tartarugas-marinhas (AGUIRRE et al., 1995; LUTZ, 1998), porém os parâmetros e valores limítrofes ainda não foram definidos.

Analisando os dados da Tabela 14 é possível verificar que a contagem de bactérias heterotróficas e coliformes termotolerantes não excederam o estabelecido pela legislação previamente citada. Contudo, a quantidade de bactérias heterotróficas e coliformes termotolerantes aumentou nas 3 praias analisadas, após o período do verão. Este aumento foi mais significativo nas praias do Camburi e Barra Seca e principalmente para coliforme termotolerantes que passaram de ausentes para presentes com mais de 200 Unidades Formadoras de Colônias por 100 mililitros de amostra (UFC/100 mL).

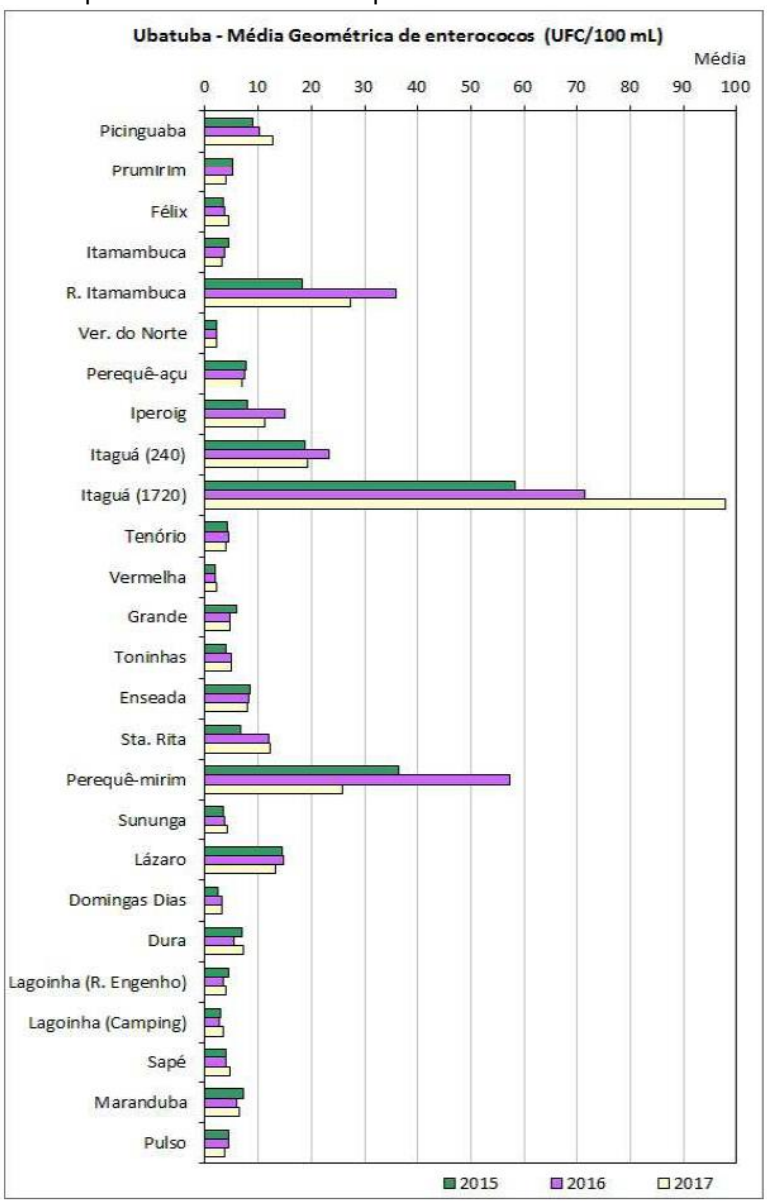
Uma possibilidade a ser investigada, é que os limites de contaminantes físico-químicos e microbiológicos que afetam a saúde de tartarugas-marinhas, bem como de outros organismos aquáticos, sejam diferentes daqueles que afetam a saúde de seres-humanos, na qual se baseiam as legislações vigentes. Tal hipótese nos leva a questionar se praias, que são áreas de alimentação para tartarugas-marinhas, não deveriam ser enquadradas na “classe especial”. Segundo a Resolução CONAMA nº 274 de 2000, esta classe de águas devem ser mantidas as condições naturais, sendo proibido o lançamento de efluentes ou disposição de resíduos domésticos, agropecuários, de aquicultura, industriais e de quaisquer outras fontes poluentes, mesmo que tratados. Estes corpos de água são destinados a “a) à preservação dos

ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral; e b) à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas".

O número de coletas de amostras de água, para a análise dos parâmetros de qualidade da água do mar, não foi suficiente para que se pudesse encontrar alguma correlação direta entre estes fatores e a detecção de ChHV5 e incidência de FP. Além disso, não foi possível obter amostras de animais dessas três praias nas duas coletas de água, inviabilizando uma comparação.

O Gráfico 5, exibe as médias geométricas de enterococos dos últimos três anos para as praias monitoradas pela CETESB.

Gráfico 5 – Número de Médias geométricas de enterococos dos últimos três anos para as praias monitoradas pela CETESB no município de Ubatuba



Fonte: Relatório CETESB, Qualidade das Praias Litorâneas no Estado De São Paulo 2017 (SÃO PAULO, 2018)

As praias de Itaguá e Enseada, que tiveram um grande número de animais com FP e/ou ChHV5 detectado por este estudo são monitoradas pela CETESB. Segundo a avaliação dos anos de 2015, 2016 e 2017 (Gráfico 5) para enterococos, microorganismos indicadores de poluição fecal, mostra que na maioria das praias essa média foi inferior a 10 UFC/100 mL, inclusive na praia de Enseada, mas a praia de Itaguá foi uma exceção, pois apresentou médias geométricas superiores a 50 UFC/100 mL, chegando até 98 UFC/100 mL. Vale mencionar que os pontos da Praia de Itaguá apresentaram as maiores médias geométricas do município em 2017.

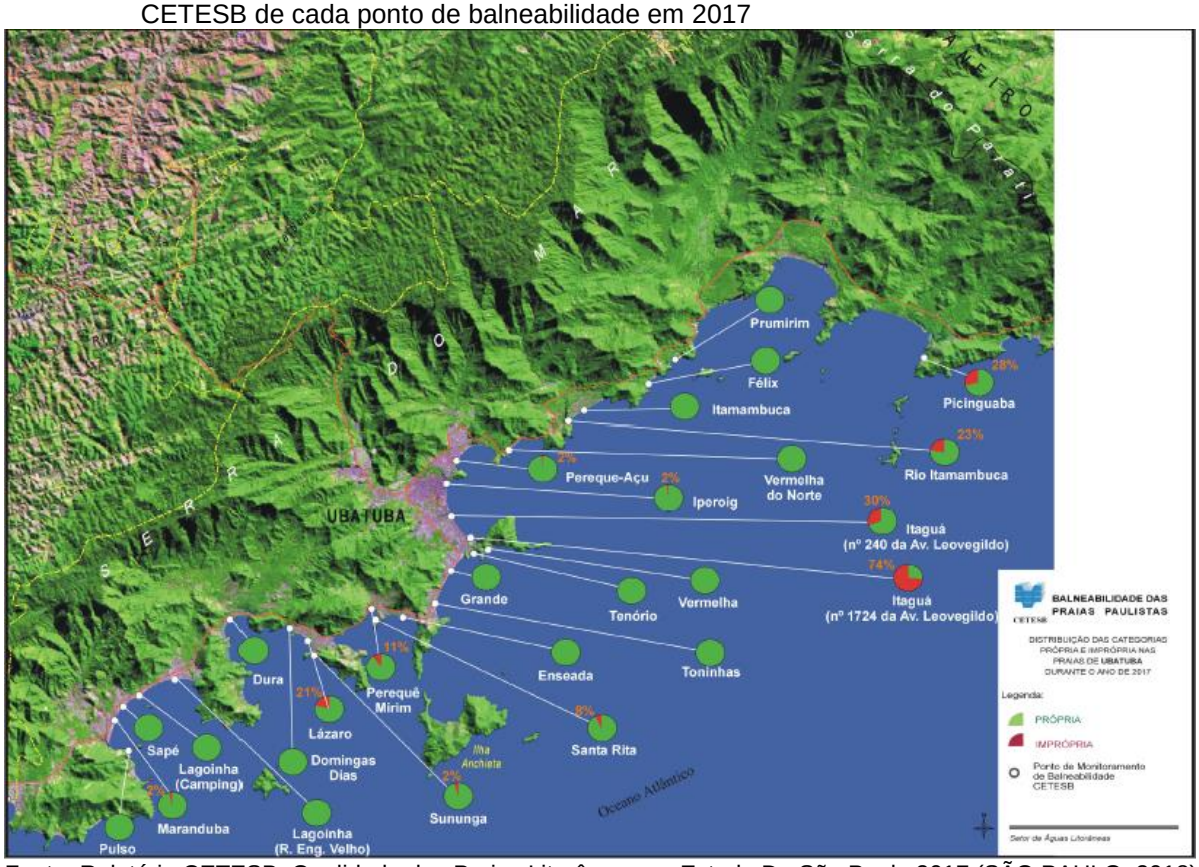
Enterococcus spp. foi encontrado em associação com infecções respiratórias, articulares e cutâneas que se desenvolveram durante o período de reabilitação de tartarugas *L. kempii* mantidas temporariamente em cativeiro (INNIS et al. 2014); assim como em lesões de FP em tartarugas-verdes, e em lesões de bexiga, fígado, pulmões e músculos em *C. caretta* (AGUIRRE et al., 1994; FICHI et al., 2016; de MORAIS et al., 2011).

Pereira (2016) encontrou diferentes espécies de enterococos que compõem a microbiota do trato gastrointestinal de tartarugas-de-pente e tartarugas-verde no Litoral Norte do Rio Grande Do Sul. Algumas dessas espécies de enterococos apresentaram genes de virulência e/ou resistência a antimicrobianos que podem estar relacionadas a fatores antropogênicos. Alguns estudos que avaliavam a qualidade da água de praias recreativas também demonstraram elevados percentuais de resistências em enterococos a diversos antimicrobianos utilizados comumente na clínica médica e veterinária, confirmando a ocorrência de resistência em ecossistemas marinhos (BENNANI et al., 2012; DADA et al., 2013; AHMAD et al., 2014).

Pereira (2016) sugere que essas linhagens bacterianas resistentes podem constituir um reservatório desses genes e, sendo o ecossistema marinho um meio de disseminação, é importante considerar o potencial dos enterococos em ocasionar riscos à saúde das tartarugas-marinhas, assim como para outros organismos que compartilham o mesmo ambiente. Logo, seria importante o desenvolvimento de estudos que avaliassem a relação entre níveis de infestação bacteriana e sinais clínicos e patológicos associados a FP (AGUIRRE et al., 1994).

A Figura 5, apresenta a distribuição das categorias Própria e Imprópria da CETESB para as praias de Ubatuba analisadas em 2017.

Figura 5 – Imagem de satélite de Ubatuba, com a distribuição das categorias Própria e Imprópria da CETESB de cada ponto de balneabilidade em 2017



Fonte: Relatório CETESB, Qualidade das Praias Litorâneas no Estado De São Paulo 2017 (SÃO PAULO, 2018)

Os resultados exibidos na Figura 5 nos mostram que os pontos de amostragem com classificação “Imprópria” são muitas vezes circundados por pontos com classificação “Própria”. Assim, mesmo tartarugas-marinhas que permanecem em áreas menos afetadas pela entrada de matéria orgânica de origem antrópica, particularmente esgoto sanitário, podem ter contato com áreas mais impactadas, umas vez que já foi descrito na literatura que os indivíduos podem circular entre diferentes áreas de alimentação mesmo que estas estejam a quilômetros de distância uma das outras (PAPI, LUSCHI, 1996; LUSCHI et al., 1998; GALLO et al., 2006). Esta hipótese pode explicar a alta incidência de animais portadores do agente viral e da FP mesmo em praias onde a detecção de insultos biológicos e químicos de caráter antropogênico foi baixa em relação ao estipulado por órgãos de fiscalização. Assim, futuros estudos relacionando o lançamento de esgoto e a FP devem levar em consideração, regiões geográficas, uma vez que, os animais podem circular por praias que sejam próximas e de fácil acesso entre elas, e assim entrar em contato com poluentes que a literatura sugere que possam induzir à quebra da latência viral ou causem imunossupressão, contribuindo para o desenvolvimento da FP (HERBST;

KLEIN, 1995) assim como aumento de sua prevalência (ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997).

O monitoramento da FP nas tartarugas-marinhas é um indicador da saúde dos ecossistemas marinhos (AGUIRRE, LUTZ, 2004; FLINT et al., 2010) e contribui para o rápido reconhecimento da manifestação da doença permitindo que medidas de prevenção e controle, com foco na proteção de áreas naturais contra mudanças antrópicas, como a poluição (CHAVES et al., 2017). Para tanto, o uso de técnicas moleculares sensíveis em diferentes tecidos biológicos, como a metodologia empregada do presente estudo, é indispensável para permitir a detecção do ChHV5 mesmo em infecções recentes (CHAVES et al., 2017).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo se baseou na detecção molecular de ChHV5, utilizando quatro *primers* que amplificam regiões de diferentes tamanhos, em diferentes tecidos de tartarugas-verdes, com o intuito de contribuir para a elucidação de aspectos epidemiológicos e relacionados à patogênese da fibropapilomatose através de uma metodologia mais sensível.

A prevalência do vírus foi determinada a nível tecidual, além de uma análise por indivíduo para dois grupos distintos: animais necropsiados e animais vivos. A determinação por indivíduo se deu a partir da avaliação conjunta da presença ou ausência de ChHV5 nos diferentes tecidos avaliados. Essa perspectiva permite que sejam formuladas hipóteses sobre a patogênese FP e a disseminação do vírus na região do Litoral Norte de São Paulo.

A detecção de ChHV5 em tecidos tumorais e em indivíduos acometidos pela doença, reforça as evidências do ChHV5 como o agente etiológico da FP, assim como descrito em outros estudos. Por outro lado, a presença do agente em tecidos e indivíduos sem a manifestação de lesões demonstra o comportamento dos alphaherpesvirus, indicando possíveis locais de persistência viral por infecção latente além do caráter multifatorial da doença.

Tendo em vista a grande porcentagem de detecção do vírus em pulmões e gônadas, principalmente em indivíduos sem sinais clínicos da FP, e a alta prevalência encontrada em indivíduos acometidos e não acometidos pela doença, hipóteses podem ser levantadas a respeito da patogênese da FP. Tanto pulmões como gônadas podem ser um local de persistência viral por infecção latente e/ou um local de infecção primária, sugerindo pelos menos duas vias de infecção. Além disso, a inclusão deste órgão na avaliação alterou a frequência de indivíduos portadores, sendo responsável pela alta prevalência encontrada nesses animais.

Mais trabalhos avaliando a detecção e quantificação do vírus em órgãos internos podem esclarecer quanto ao envolvimento dos sistemas respiratório e reprodutor na transmissão e infecção do ChHV5.

A detecção molecular do agente viral com a utilização de *primers* que amplificam regiões de diferentes tamanhos, bem como uma análise utilizando diferentes tecidos favoreceu a detecção do vírus em tartarugas, mesmo que não existam sinais clínicos da FP, sendo essa uma técnica sensível que permite a

detecção mesmo em infecções recentes. Este é um ponto importante para o monitoramento de animais que são reservatórios virais, facilitando a disseminação do agente etiológico e da doença.

A correlação entre escore de FP (FPS) e a detecção de ChHV5 demonstrou que em animais com grau severo da doença, o vírus foi detectado em todos os tecidos avaliados. Este é um indício de que em animais com FPS severo a infecção por ChHV5 esteja disseminada, o que representa uma grande probabilidade de disseminação do vírus no ambiente por esses indivíduos.

Os dados analisados no presente estudo evidenciam dois fatores preocupantes: a grande porcentagem de detecção do agente viral em gônadas de indivíduos acometidos e não acometidos pela FP, principalmente em fêmeas, que pode significar uma via de transmissão direta através a cópula e/ou entre fêmeas e filhotes; e também, o fato do vírus ser praticamente onipresente, independente das condições clínicas dos animais, uma vez que foi encontrada neste estudo uma prevalência de 100% nos animais necropsiados e 80% nos animais vivos analisados.

A cerca da caracterização molecular de ChHV5, foi possível observar que ss sequências de DNA polimerase de amostras de sangue e tumor identificadas neste estudo tiveram 100% de identidade com outras sequências provenientes de amostras de pele, tumor e secreções oral e ocular coletadas em Ubatuba/SP. Portanto, um mesmo haplótipo do agente viral parece ser capaz de infectar diferentes tecidos do hospedeiro.

Ademais, a sequência obtida de uma amostra de ovário neste estudo foi compatível com uma sequência encontrada em Fernando de Noronha/PE. O que nos leva a algumas constatações: 1) os animais encontrados no Litoral Norte de São Paulo parecem estar infectados por mais de um haplótipo viral; 2) os vírus podem ser transportados pelas tartarugas durante suas rotas migratórias; 3) este pode ser considerado mais um indício de transmissão vertical em ChHV5, contudo, análises com ovos e filhotes se fazem necessárias que se possa confirmar esta possibilidade.

As implicações destes dois fatores nas populações de tartarugas-marinhas são negativas e sérias. Os animais selvagens já sofrem intensa pressão antropogênica levando a perda de habitat e redução drástica no número de indivíduos. Doenças emergentes, como a FP, nestas populações podem potencialmente aceleram o processo de extinção.

A análise da qualidade da água de praias onde foram encontrados animais com e sem sinais clínicos da FP, mas portadores do ChHV5, demonstrou que algumas regiões estão mais poluídas que outras, o que nos leva a criar algumas hipóteses: 1) As tartarugas-marinhas podem circular entre praias próximas e assim entrar em contato com insultos químicos e biológicos que podem afetar sua imunidade, deixando-os mais suscetíveis a patógenos; 2) os limites de contaminantes físico-químicos e microbiológicos que afetam a saúde de tartarugas-marinhas, bem como outros organismos aquáticos, podem ser diferentes daqueles que afetam a saúde de seres-humanos e dos quais se baseiam as legislações vigentes. Assim, mesmo praias que estão dentro dos padrões exigidos por órgãos de fiscalização, podem estar comprometendo a saúde de organismos aquáticos.

Estas interpretações nos levam a ponderar se áreas com grande incidência de tartarugas-marinhas, como são áreas de alimentação, não deveriam ser enquadradas na “classe especial” de corpos d’água da Resolução CONAMA nº 274 de 2000, a fim de preservar os ambientes e comunidades aquáticas através de proteção integral.

O presente trabalho buscou contribuir na elucidação de aspectos importantes da FP, como patogêneses e transmissão do agente viral. Estes resultados podem direcionar futuros estudos, de modo a permitir o monitoramento dessa doença e assim auxiliar na prevenção e controle da mesma através de intervenções diretas nos animais ou indiretas, pela proteção de áreas naturais contra mudanças antrópicas, como a poluição.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.; KORIABINE, M.; HARTMANN-FRITSCH, F.; JONG, P. J.; LEWIS, T. D.; SCHETLE, N.; WORK, T. M.; DAGENAIS, J.; BALAZS, G. H.; LEONG, J. C. The genome of *Chelonid Herpesvirus 5* Harbors Atypical Genes. **PLOS One**, v.7, n.10, p.1-15, 2012.

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

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

AGUIRRE, A. A. **et. al.** Pathology of fibropapillomatosis in Olive Ridley Turtles *Lepidochelys olivacea* Nesting in Costa Rica. **Journal of Aquatic Animal Health**, 11:283-289, 1999.

AGUIRRE, A. A. **et. al.** Spirorchids and fibropapillomas in the green turtles from the Hawaiian Islands. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n.1, p. 91-98, 1998.

AGUIRRE, A. A. **et al.** Evaluation of hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. **J Wildl Dis** 30:8–15, 1994.

AHMAD, A. **et al.** Occurrence of *Enterococcus* species with virulence markers in an urban flow-influenced tropical recreational beach. **Mar. Pollut. Bull**., v.82, n.1-2, p.26-38, 2014.

ALFARO-NUÑEZ, A.; GILBERT, M. T. P. Validation of a sensitive PCR assay for the detection of *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* in latente turtle infections. **Journal of Virological Methods**, Amsterdan, n.206, p.38-41, 2014a.

ALFARO-NUÑEZ, A. et al. Global distribution of chelonid fibropapilloma associated herpesvirus among clinically healthy sea turtles. **BMC Evolutionary Biology** 14, 1–12, 2014b.

ALTSCHUL, S. F. **et al.** Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology,** London, v.215, p. 403-410, 1990.

ARZUL, I. **et al.** Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. **Virus Research** 84: 151–160, 2002.

ASSOCIATION (WDA) AMÉRICA LATINA, 1., 2013, São Paulo. **Resumos...**São Paulo: WDA Latin América, p.43-44, 2013b.

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-NOAA Technical Memorandum NMFS-SWFSC-156, P.47-57, 1991.

BENNANI, M. **et al.** Identification and antimicrobial resistance of fecal Enterococci isolated in Coastal Mediterranean environments of Morocco. Eur. J. Sci. Res., v.70, n.2, p.266-275, 2012.

BAPTISTOTTE, C. Proceedings of the 2015 **International Summit on Fibropapillomatosis: Global Status, Trends and Population Impacts**. 87p. NOOA Technical Memorandum NMFS-PIFSC-54- Pacific Islands Fisheries Science Center, 2016.

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

BERUMEN, J. **et al.** Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: A case- control study. **Journal of the National Cancer Institute**, v.93, p.1325-1330, 2001.

BJORNDAL, K. A. Nutrition and grazing behavior of the green turtle *Chelonia mydas*. Marine Biology 56: 147-154, 1980.

BJORNDAL, K. A., Biology and Conservation of Sea Turtles. Smithsonian Institution Press, Washington, 1995.

BJORNDAL, K. A. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. *In*: LUTZ, P.; MUSICK, J.A. **The biology of sea turtles.**1 ed. Boca Raton: CRC Press, p. 199-232, 1997.

BJORNDAL, K. A. Roles of loggerhead sea turtles in marine environments. In Bolten, A.B. and Witherington, B.E. (Eds.) Loggerhead Sea Turtles. Smithsonian Institution Press, Washington, DC. Pp. 235-254, 2003.

BJORNDAL, K. A; JACKSON, J. B. C. Roles of sea turtles in marine ecosystems: Reconstructing the past. In Lutz, P.L., Musick, J.A. and Wyneken, J. (Eds.) **The Biology of Sea Turtles Volume II**. CRC Press, Boca Raton, Florida (USA). Pp. 259-273, 2003.

BOUCHARD, S. S.; BJORNDAL, K. A. Sea turtles as biological transporters of nutrients and energy from marine to terrestrial ecosystems. **Ecology**, 81: 2305-2313, 2000.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Manual Prático de Análise de Água. Fundação Nacional de Saúde, ed.4. Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria n.º 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 14 de dezembro de 2011.

BRASIL. Congresso. Senado. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Alterado pela Resolução CONAMA 410/2009 e pela 430/2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/conama>. Acesso em: 10 abr. 2017.

BRITO, F. L. C. **et al.** Fibropapillomatosis and multiple fibromas in a green turtle from the South Cost of Pernambuco State, Brazil. **Marine Turtle Newsletter**, v.106, n.12, 2004.

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.

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

CARR, A.; CARR, M. H.; MEYLAN, A. B. The ecology and migrations of sea turtles, 7. The West Caribbean green turtle colony. **Bulletin of the American Museum of Natural History**,162(1):1-46, 1978.

CHALOUPKA, M.; BALAZS, G. Modelling the effect of fibropapilloma disease on the somatic growth dynamics of Hawaiian Green sea turtles. **Marine Biology**, 147; 1251-1260, 2005.

CHAVES, A. **et al.** Examining the Role of Transmission of *Chelonid Alphaherpesvirus-5*. **EcoHealth**, (DOI: 10.1007/s10393-017-1248-7), 2017.

D'AMATO, A. F.; MORAES-NETO, M. First Documentation of Fibropapillomas Verified by Histopathology in *Eretmochelys imbricata*. **Marine Turtle Newsletter**, 89: 12-13, 2000.

DAVISON, A. J. **et al.** The order Herpesvirales. **Archives of Virology**, v.154, n.1. p.171-177, 2009.

de MORAIS, P. B. **et al.** Enterobacteriaceae in mouth and cloaca of *Podocnemis expansa* and *P. unifilis* (Testudines: Chelonia) populations of National Park of Araguaia plains, Brazil. **Braz J Microbiol** 42:526–530, 2011.

DÍAZ-DELGADO, J. **et al.** Primary Multicentric Pulmonary Low-grade Fibromyxoid Sarcoma and *Chelonid Alphaherpesvirus 5* Detection in a Leatherback Sea Turtle (*Dermochelys coriacea*). **Journal of Comparative Pathology.** Vol. 168, 1-7, 2019.

CHEN, T.; HUDNALL, S. D. Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection. Modern Pathology, v.19, p.726-737, 2006.

CURRY, S. S. **et al.** 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.

DADA, A. C. **et al.** Speciation and antimicrobial resistance of Enterococci isolated from recreational beaches in Malaysia. **Environ. Monit. Assess**, v.185, p.1583-1599, 2013.

DERUELLE, M. J.; FAVOREEL, H. W. Keep it in the subfamily: the conserved alphaherpesvirus US3 protein kinase. **Journal of General Virology**, London, v. 92, p. 18-30, 2011.

DELLINGER, T.; DAVENPORT, J.; WIRTZ, P. Comparisons of social structure of Columbus crabs living on loggerhead sea turtles and inanimate flotsam. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom** 77(1): 185-194, 1997.

DOBBS, K. Marine turtles in the Great Barrier Reef World Heritage Area : a compendium of information and basis for the development of policies and strategies for the conservation of marine turtles. **Great Barrier Reef Marine Park Authority Townsville**. Queensland, 2001.

DOS SANTOS, R.G. **et al.** Relationship between fibropapillomatosis and environmental quality: A case study with *Chelonia mydas* of Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms** 89, 87–95, 2010.

DOWELL, S. E. Seasonal Variation in Host Susceptibility and Cycles of Certain Infectious Diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v.7,n3: p.369-74, 2001.

DUARTE, A. **et al.** First histological and virological report of fibropapilloma associated with herpesvirus in *Chelonia mydas* at Principe Island,West Africa. **Archives of Virology**, 157, 1155–1159, 2012.

DUTRA, G. H. P; NASCIMENTO, C. L; FUTEMA, F. Fibromas viscerais associados ao fibropapiloma cutâneo em *Chelonia mydas* em reabilitação. **Natural Resources**, v.2, n.2, p.50-62, 2012.

ENE, A. **et al.** Distribution of chelonid fibropapillomatosis associated herpesvirus variants in Florida: molecular genetic evidence for infection of turtles following recruitment to neritic developmental habitats. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.41, n.3, p.489-497, 2005.

ERNEST, C. H.; BARBOUR, R. W. Turtles of the World. Washington, D. C. **Smithsonian Institution Press**, p. 313, 1989.

FLINT, M., PATTERSON-KANE, J. C., LIMPUS, C. J., MILLS, P. C. Health surveillance of stranded Green turtles in southern Queensland, Australia (2006–2009): An epidemiological analysis of causes of disease and mortality. **Ecohealth 7**, 135–145, 2010.

FOLEY, A. M. **et al.** Fibropapillomatosis in stranded Green turtles (*Chelonia mydas*) from the eastern United States (1980–98): Trends and associations with environmental factors. **Journal of Wildlife Diseases**. 41, 29–41, 2005.

FORMIA, A. **Population and genetic structure of the Green turtle (*Chelonia mydas*) in West and central Africa: implications for management and conservation.** p. 270. Thesis for Doctor of Philosophy – Cardiff University, 2002.

FICHI, G. **et al.** Bacterial and viral pathogens detected in sea turtles stranded along the coast of Tuscany, Italy. **Vet Microbiol** 185:56–61, 2016

FRICK, M. G. **et al.** Diet and fecundity of Columbus crabs, *Planes minutus*, associated with oceanic-stage loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, and inanimate flotsam. **Journal of Crustacean Biology** 24 (2): 350-355, 2004.

FULLER, M.; PRIOSTE, F. E. S.; MATUSHIMA, E. R. Poluição química dos mares pode ajudar na disseminação de fibropapilomatose em tartarugas verdes. **Agência Universitária de Notícias - AUN**, São Paulo, SP, p. 1 - 2, 28 out. 2015.

GALLO, B. M. G. **et al.** 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.

GATTAMORTA, M. A. **et al.** Prevalence and molecular characterization of *Chelonid Herpesvirus-5* (ChHV5) in green turtle (*Chelonia mydas*) with an without fibropapillomatosis in areas of brazilian atlantic coast. In: **37th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation**, Las Vegas, Nevada, USA, 2017.

GATTAMORTA, M. A. **Ecologia, prevalência e caracterização molecular de *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) em Tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) em áreas da costa brasileira**, Tese (Doutor em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, P. 122, 2016a.

GATTAMORTA, M. A. **et al.** Evidence of neural tropism by *Chelonid Herpesvirus-5* in *Chelonia mydas*. In: **36th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation**, Lima. Book of Abstracts of 36th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. Lima, v. 1. p. 1-1, 2016b.

GATTAMORTA, M. A. **et al.** Detection of Alphaherpesvius in secretions of *Chelonia mydas* in the brazilian Atlantic coast. In: **36th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation**, 2016, Lima. book of Abstracts of 36 th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. Lima, v. 1.p. 1-1, 2016c.

GREENBLATT, R. J. **et al.** Geographic variation in marine turtle fibropapillomatosis. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Washington, v.35, p.527-530, 2005.

GIBBONS, M. J.; RICHARDSON, A. J. Patterns of jellyfish abundance in the North Atlantic. **Hydrobiologia**, 616:51-65, 2009.

GULKO, D.; ECKERT, K. Sea turtles: An ecological guide. **Mutual Publishing**, Hawaii, 2004.

GYURIS, E. The rate of predation by fishes on hatchlings of the green turtle (*Chelonia mydas*). **Coral Reefs**, 13:137-144, 1994.

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

HANNAN, L. B. **et al.** Dune vegetation fertilization by nesting sea turtles. Ecology 88(4): 1053-1058, 2007.

HERBST, L. H. **et al.** Use of bacilovirus-expressed glycoprotein H in ELISA developed to assess exposure to chelonid fibro-papillomatosis-associated herpesvirus and its relationship to the prevalence of fibropapillomatosis in sea turtles. **Clin Vaccine Immunol** 15: 843−851, 2008

HERBST, L. H. **et al.** Tumor outbreaks in marine turtles are not due to recent herpesvirus mutation. **Current Biology**, v.14, n.17, p.697-699, 2004.

HERBST, L. H. **et al.** 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.

HERBST, L. H. **et al.** Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v.22, p.1-12, 1995a.

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

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

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

ICMBio, 2010. Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para a Conservação da Herpetofauna Insular Ameaçada de Extinção. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-herpetofauna/icmbio-sumario-herpetofauna-web.pdf>. Acesso em 20 de Junho de 2017.

ICMBio, 2014. Listas das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Portarias MMA nº 444/2014 e nº 445/2014. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies>. Acesso em 01 de Outubro de 2016.

ICTV, 2019. Virus Taxonomy: 2019 Release. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em 05 de Setembro de 2017.

INNIS, C. J. **et al.** Diagnosis and management of Enterococcus spp infections during rehabilitation of cold-stunned Kemp's ridley turtles (*Lepidochelys kempii*): 50 cases (2006-2012). J Am Vet Med Assoc 245:315–323, 2014

IUCN, 2019. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-1. <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 11 de maio de 2019.

JACOBSON, E. R. **et al.** Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green turtle *Chelonia mydas*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.12, n.1, p.1-6, 1991.

JACKSON, J. B. C. **et al.** Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. **Science** 293(5530): 29–637, 2001.

JAMES, S. H.; SHEFFIELD, J. S.; KIMBERLIN, D. W. Mother-to-Child Transmission of *Herpes Simplex Virus*. Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society 3: 19-23, 2014.

JONES, K. **et al.** A review of fibropapillomatosis in Green Turtles (*Chelonia mydas*). **The Veterinary Journal**. v. 212, p.48-57, 2016.

JORGE, M. C. O. **Zoneamento ambiental do município de Ubatuba - SP**. 2004. vi, 110 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, 2004. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/95584>.Acesso em:31 Maio de 2019.

KAASHOEK, M. J. **et al.** Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1. 1 strains: Clinical and virological and aspects. **Veterinary Record**, v.139, p.416-421, 1996.

LACKOVICH, J. K. **et al.** Association of herpesvirus with fibropapillomatosis of the green turtle *Chelonia mydas* and the loggerhead turtle *Caretta caretta* in Florida. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.37, p.89-97, 1999.

LAEGREID, W. W. **et al.** Characterization of virulence variants of African Horse sickness virus**. Virology**, 195, p.836-839, 1993.

LEON, Y. M.; BJORNDAL, K. A. Selective feeding in the hawksbill turtle, an important predator in coral reef ecosystems. **Marine Ecology Progress Series** 245: 249-258, 2002.

LU, Y. **et al.** Detection of herpesviral sequences in tissues of green turtles with fibropapilloma by polymerase chain reaction. **Archives of Virology**, v.145, p.1885-1893, 2000.

LUSCHI, P. **et al.** (1998). The navigational feats of green sea turtles migrating fromAscension Island investigated by satellite telemetry. Proc. R. Soc.Lond. B 265, 2279–2284, 1998.

LUTCAVAGE, M. E. **et al.** Human impacts on sea turtle survival. in: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (eds.). The Biology of Sea Turtles. CRC Press., p.387-409, 1997.

LUTZ, P. L. The Biology of Sea Turtles, vol. II. **CRC Press**, Hoboken, USA, 2002.

LUTZ, P. L. Salt, water, and pH balance in the sea turtle. In: Lutz, P. L. and Musick, J. A. (eds.). The Biology of Sea Turtles. Boca Raton, FL: **CRC Press.** p. 343–361, 1997.

MANNICK, J. B. **et al.** Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. **Cell,** 79, 1137–1146, 1994.

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, pt. 1, p. 30-33. (Série Espécies Ameaçadas, 25), 2011.

MARSCHANG, R. E. Viruses infecting reptiles. **Viruses**, Basel, n.3, p.2087-2126, 2011.

MARENZONI, M. L. **et al.** Clinical, virological and epidemiological characterization of an outbreak of Testudinid Herpesvirus 3 in a chelonian captive breeding facility: Lessons learned and first evidence of TeHV3 vertical transmission. **PLoS ONE** 13(5), e0197169. (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197169), 2018.

MATEU, M. G. The Structural Basis of Virus Function. In: MATEU, M. G. **Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook.** Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2013, p. 17.

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

MATUSHIMA, E. R. **et al.** 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.

MATUSHIMA, E. R. **et al.** Cutaneous papillomas of green turtles: a morphological and immunohistochemical study in brazilian specimens. In: **Annual Symposium on Sea Turtle Conservation and Biology**, 19. Texas. **Proceedings**..., p. 237 – 239. U. S. Dep. Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC – 443, 1999.

MCGEOCH, D. J.; GATHERER, D. Integrating reptilian herpesviruses into the family Herpesviridae. **J. Virol**. 79, 725-731, 2005.

MEHNERT, D. U. **et al.** Estudo etiológico de Fibropapilomatose de tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas*. 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. Introduction to the evolution, life history, and biology of sea turtles. In: ECKERT, K. L.; BJORNDAL, K. A.; ABREU-GROBOIS, F. A.; DONNELLY, M. (Ed.). **Research and Management techniques for the conservation of sea turtles.** (**IUCN/SSC Marine Turtle specialist group publication, 4)**, 1999.

MEYLAN, A. B.; BOWEN, B. W.; AVISE, J. C. A genetic text of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. **Science**, v.248, p.724-727, 1990.

MEYLAN, A. Spongivory in hawksbill turtles: A diet of glass. **Science** 239(4838): 393-395, 1988.

MESQUITA, L. P.; AREVALO, A. F.; ZANNATO, D. A.; MIYASHIRO, S. I.; CUNHA, E. M. S.; SOUZA, M. C. C.; VILLALOBOS, E. M. C.; MORI, C. M. C.; MAIORKA, P. C.; MORI, E. Equine herpesvirus type 1 induces both neurological and respiratory disease in Syrian hamster. **Veterinary Microbiology**, v.203, p.117-124, 2017a.

MESQUITA, L. P.; COSTA, R. C.; FUSUMA. M. M.; BRUHN, F. R. P.; MORI, E.; PITUCO, E. M.; MORI, C. M. C.; WEIBLEN, R.; MAIORKA, P. C. Susceptibility of mice to bovine herpesvirus type 5 infection in the central nervous system. **Veterinary Research Communications**, v.41, n.4, p279-288, 2017b.

MONEZI, T. **et al.** Chelonid herpesvirus 5 in secretions and tumor tissues from green turtles (*Chelonia mydas*) from Southeastern Brazil: A ten-year study. **Veterinary Microbiology** (Amsterdam. Print), v. 186, p. 150-156, 2016.

MONEZI, T. A. **et al.** 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, p. 21, 2006.

NARO-MACIEL, E. **et al.** Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. **Journal of Heredity**, v.98, n.1, p.29-39, 2007.

PAGE-KARJIAN, A. **et al.** Potential non-cutaneous sites of *Chelonid herpesvirus 5* persistence and shedding in green sea turtles (*Chelonia mydas*). **Journal of Aquatic Animal Health** 29, 136–142, 2017.

PAGE-KARJIAN, A. **et al.** Quantifying *Chelonid herpesvirus 5* in symptomatic and asymptomatic rehabilitating Green sea turtles. **Endang Species Res** 28: 135-146, 2015.

PAGE-KARJIAN, A. **et al.** Presence of chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus in tumored and non-tumored green turtles, as detected by polymerase chain reaction, in endemic and non-endemic aggregations, Puerto Rico. **Springer-Plus 1: 35−50, 2012.**

PAILLOT, R. **et al.** Equine herpes virus-1: virus, immunity and vaccines. **The Open Vet Sci** J 2: 68−91, 2008.

PAPI, F.; LUSCHI, P. (1996). Pinpointing 'Isla Meta': the case ofsea turtles and albatrosses. **J. Exp. Biol**. 199, 65–71, 1996.

PATRICIO, A. R. **et al.** Global phylogeography and evolution of chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus. The Journal of General Virology 93, 1035, 2012.

PETROBRAS. Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos – Fase 1: 3º Relatório Técnico Anual (2017-2018) (Gerenciamento e Execução do Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos – Fase 1) (p. 158). Itajaí, SC: UNIVALI/PETROBRAS. Revisão 00. (p. 270). CTA Ambiental/ PETROBRAS, 2019.

PERANZONI, E. **et al.** Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. **Immunobiology** 212, 795–812, 2008.

PEREIRA, R. I. **Diversidade genética e fatores de virulência de *Enterococcus spp*. isolados de amostras fecais de tartarugas marinhas recuperadas no Litoral Norte do Rio Grande Do Sul, Brasil.** Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (154p.) março, 2016.

PLANCOULAINE, S. **et al.** Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population. **Lancet**; 356: 1062–65, 2000.

PITMAN, R. L. Seabird associations with marine turtles in the eastern Pacific Ocean. **Colonial Waterbirds** 16(2): 194-201, 1993.

PRIOSTE, F. E. S. **et al.** Mercury concentrations in the blood of green turtles (*Chelonia mydas*) captured in brazilian coast - preliminary results.. In: 36th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, 2016, Lima. **Book of Abstracts of 36th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation**. Lima, v. 1. p. 1-1, 2016a.

PRIOSTE, F. E. S. **Detecção e quantificação de alguns elementos químicos inorgânicos em sangue e tecidos de tartarugas-verdes –*Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) - da costa brasileira: possível correlação com a Fibropapilomatose.** Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. *Orientador:* Eliana Reiko Matushima. 2016b.

PRIOSTE, F. E. S. **et al.** Concentrações de mercúrio em sangue de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) capturadas na costa brasileira: resultados preliminares. In: XXIV Semana Científica Prof. Dr. Benjamin Eurico Malucelli/ Semana do VPT, 2015, São Paulo/SP. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**. São Paulo. v. 14. p. 61-61, 2015a.

PRIOSTE, F. E. S. **et al.** Concentrations of some chemical elements in blood of Green Sea Turtles (*Chelonia mydas*) captured at Parque Nacional Marinho de Fernando de Noronha, Brazil. In: 35 th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, 2015, Dalaman. **Book of Abstracts of 35 th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation**. Dalaman,2015b. v. 1. p. 11-11.

PRIOSTE, F. E. S. **et al.** Chemical Element Concentrations in the Blood of Green Turtles (*Chelonia Mydas*) Captured at Fernando De Noronha Marine National Park, Brazil. Research Article: **J Environ Anal Toxicol**, 5:325, 2015c.

PRIOSTE, F. E. S. **et al.** Detecção das concentrações de elementos essenciais e metais encontrados no sangue de tartarugas marinhas (*Chelonia mydas*) juvenis capturadas na costa brasileira.. In: XXIII Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli, 2014, São Paulo/SP**. Anais da XXIII Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli**, 2014.

PRITCHARD, P. C. H.; MORTIMER, J. A. Taxonomia, morfologia externa e identificación de lãs espécies. 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**, p.23-44, 2000.

PURCELL, J. E., SHIN-ICHI, U., WEN-TSENG, L. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans: A review. **Mar. Ecol. Prog. Ser**. 350: 153-174, 2007.

QUACKENBUSCH, S. L. **et al.** Quantitative analysis of herpesvirus sequences from normal tissue and fibropapillomas of marine turtles with real time PCR. **Virology**, New York, v.287, p.105-111, 2001.

RAWSON, P. D. **et al.** Phylogeography of the coronulid barnacle, *Chelonibia testudinaria*, from loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*. **Molecular Ecology** 12: 2697-2706, 2003.

RODENBUSCH, C. R. **et al.** Fibropapilomatosis in Green turtles *Chelonia mydas* in Brasil: characteristics of tumors and vírus. **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v. 111, p. 207-217, 2014.

RODENBUSCH, C. R. **Detecção e caracterização do herpesvirus associado a fibropapilomatose em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) na Costa Brasileira.** 85p. Tese (Doutor em Ciências Veterinárias na área de Virologia) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ROSSI, S. **et al.** Immune Response of Green Sea Turtles with and without Fibropapillomatosis: Evaluating Oxidative Burst and Phagocytosis via Flow Cytometry. **Chelonian Conservation and Biology**, vol. 15, n. 2, p. 273-278, (DOI:10.2744/ccb-1202.1) 2016a.

ROSSI, S. **et al.** Challenges in Evaluating the Severity of Fibropapillomatosis: A Proposal for Objective Index and Score System for Green Sea Turtles (*Chelonia mydas*) in Brazil. **PLOS ONE** 11(12): e0167632. doi:10.1371/journal. pone.0167632, (DOI:10.1371/journal.pone.0167632), 2016b.

ROSSI, S. **et al.** Histopathogical and Molecular Characterization of Fibropapillomatosis in *Caretta caretta* (Testudines, Cheloniidae) Caught at Boca da Barra, Ceará, Brazil In: **International Symposium On Sea Turtles Biology And Conservation**, 35., 2015, . Abstracts… Dalaman: U.S. Department of Commerce-NOAA Technical Memorandum-NMFS-SEFSC, p. 21, 2015a.

ROSSI, S. **et al.** Analysis of corporal condition and Fibropapillomatosis manifestation in *Chelonia mydas* (Testudines Cheloniidae) studied at Brazilian feeding areas. In: **Reunião da Sessão Wildlife Diseases Association (WDA) América Latina**,2., 2015, Bogotá. Resumenes… Bogotá: WDA LatinAmerica, p. 119, 2015b.

ROSSI, S. **et al.** Determination of polychlorinatedbiphenyls in blood samplesand leukocyte activity of *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) in Brazil. In: **International Symposium On Sea Turtles Biology And Conservation**, 35., 2015, . Abstracts… Dalaman: U.S. Department of Commerce-NOAA Technical Memorandum-NMFS-SEFSC, p. 20, 2015c.

ROSSI, S. **Análise da atividade de leucócitos e de bifenilaspolicloradas aplicada ao estudo da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) (Linnaeus 1758).** 168p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"; Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ROSSI, S. **et al.** Immunosuppression Evaluation of *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) Caught in Brazil. In: **International Symposium On Sea Turtles Biology And Conservation**, 33., Baltimore. Abstracts… Miami: U.S. Department of Commerce-NOAA Technical Memorandum-NMFS-SEFSC-645, p. 26, 2013a.

ROSSI, S. **et al.** 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., São Paulo. Resumos… São Paulo: WDA Latin America p. 39-40, 2013b.

ROSSI, S. **et al.** 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 MemorandumNMFS-SEFSC-645, p. 27, 2013c.

ROSSI, S. **et al.** Possible Relation between Polychlorinated Biphenyls and Fibropapillomatosis in *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae). In: In: **Reunião da Sessão Wildlife Diseases Association (WDA) América Latina**, 1., 2013, São Paulo. Resumos… São Paulo: WDA Latin America, p. 127-128, 2013d

ROSSI, S. **et al.** A Importância do monitoramento de bifenilaspolicloradas 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., Piriápolis. Resumenes… Piriápolis: CICMAR- DINARA 2013e. p. 96-100, 2013e.

ROSSI, S. **et al.** Estabelecimiento de escores para determinar el grado de severidad de la fibropapilomatosis em *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) capturadas en la costa brasileira. In: **Congresso Latinoamericano de Reabilitação de Fauna**

Marinha, 2., Rio Grande. Resumos… Rio Grande: CRAM-Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG Aiuká, p. 161, 2012a.

ROSSI, S. **et al.** Contributions of flow cytometry and gas chromatography for conservation of *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) in Brazil. In: **Congresso Latinoamericano de Reabilitação de Fauna Marinha,** 2., Rio Grande. Resumos… Rio Grande: CRAM-Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG-Aiuká, p. 126, 2012b.

ROSSI, S. **et al.** Flow cytometry as a tool in the evaluation of blood leukocyte function in *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Cheloniidae). Brazilian **Journal of Biology**, v. 69, n. 3, p. 899-905, 2009a.

ROSSI, S. **et al.** Hematological profile of *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Cheloniidae) according to the severity of fibropapillomatosis or its absence. **Pesquisa Veterinária**, Brasil. v. 29, n. 12, p. 974-978, 2009b.

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

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M. **et al.** Organochlorine pesticides in green sea turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomatosis caught at three feeding areas of Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, vol. 1, p. 1-9, (DOI:10.1017/S002531541500226X), 2016.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M. **et al.** 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, p.29, 2013a.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M. **et al.** Distribución anatômica de fibropapilomas em tortugas verdes, *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae), capturadas em la costa brasileira. In: **Congresso Latinoamericano de Reabilitação de Fauna Marinha**, 2, 2012, Rio Grande. **Resumos...**Rio Grande: CRAM-Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG-Aiuká, p.163, 2012a.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M. et al. Comparison between corporal subjetive classification and body condition index (BCI) for *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) caught in Brazilian coast. In: **Congresso Latinoamericano de**

Reabilitação de Fauna Marinha, 2., 2012,Rio Grande. Resumos...Rio Grande: CRAM-Museu Oceoanográfico Prof. Eliézer de C. Rios-FURG-Aiuká, p.162, 2012b.

SANMARTÍN, M. L. **et al.** Evidence of vertical transmission of ostreid herpesvirus 1 in the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. **Journal of Invertebrate Pathology.** 140, 39–41, 2016.

SÃO PAULO (Estado). CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2016. Relatório e qualidade das praias no Estado de São Paulo. Disponível em: <http://praias.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-relatorios/>. Acesso em: 05 set. 2017.

SOS MATA ATLANTICA. Observando os rios: Manual de Campo. 2016. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2016/05/Manual-de-Campo-Observando-os-Rios_WEB.pdf> Access in: 22 junho 2019.

SMITH, G. M.; COATES, C. W. Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles, *Chelonia mydas* (Linnaeus). **Zoologica**, 23:93-96, 1938.

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

STACY, B. Fibropapillomatosis in 2015: A Historical Review & Modern Perspective on Why It Remains an Important Disease. IN: **Proceedings of the 2015 International Summit on Fibropapillomatosis: Global Status, Trends and Population Impacts. NOAA Tech. Memo**. Honolulu, Hawaii: U.S. Dep. Commer, 2016, p.22-25.

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

TAMURA, K. **et al.** Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likehood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular BiologyandEvolution,** Chicago, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

THAYER, G. W. **et al.** Role of larger herbivores in seagrass communities: Functional ecology of seagrass ecosystems: A perspective on plant-animal interactions. **Estuaries** 7(4): 351-376, 1984.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Multiple Sequence Alignment Using ClustalIW and ClustalIX. Current Protocols in Bioinformatics, v.00, n.1, p.2.3.1-2.3.22. 2002.

CRUZ-OCHOA, P. F. **Achados anatomo e histopatológicos de tartarugas verdes juvenis (Chelonia mydas) provenientes do litoral sudeste brasileiro**. 2017. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

VAN HOUTAN, K. S.; HARGROVE, S. K.; BALAZS, G. H. Land Use, macroalgae,and a Tumor-Forming Disease in Marine Turtles. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 9, Sept., p. 1-9, 2010.

VAN HOUTAN, K. S. **et al.** Eutrophication and the dietary promotion of sea turtle tumors. **PeerJ 2**, e602, 2014

VILCA, F. Z. **et al.** Method for determination of PAHs in liver samples of Green Sea Turtles (*Chelonia mydas*) using HPLC-FLD. In: 52nd Annual North American Chemical Residue Workshop, 2015, St. Pete Beach, Florida. **Book of Abstracts of 52nd Annual North American Chemical Residue Workshop**. Florida, 2015. v. 1. p. 66-66.

VILCA, F. Z. **et al.** Evaluation of the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the neritic areas for populations of *Chelonia mydas* of the brazilian coast and study of residues in individuals affected by fibropapillomatosis.. In: 50th Annual North American Chemical Residue Workshop / Florida Pesticide Residue Workshop, 2013, Florida. **Proceedings of 50 th Annual North American Chemical Residue Workshop** / Florida Pesticide Residue Workshop, 2013. p. 55-55.

VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3d. Belo Horizonte: UFMS, 2005.

WILLIAMS, E. H. **et al.** 1994. An epizootic of cutaneous fibropapillomasin Green turtles *Chelonia mydas* of the Caribbean: Part of a panzootic? **Journalof Aquatic Animal Health** 6, 70–78, 1994.

WITHERINGTON, B. E. Reducción de lasamenazasal habitat 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, p. 204-210 (Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación 4), 2000.

WORK, T. M. Cancer in sea turtles. **Hawaii Medical Journal**, Honolulu, v.64, p. 23-24, 2005.

WORK, T. M; BALAZS. G. H. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.35, n.4, p.804-807, out 1999.

YUNIS, R.; JAROSINSKI, K. W.; SCHAT, K. A. Association between rate of viral genome replication and virulence of Marek's disease herpesvirus strains. **Virology**, v.328, p.142-150, 2004.

ZAMANA, R. R. **Detecção de *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5) e caracterização histopatológica de fibropapilomas em Tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) no Litoral Norte do Estado de São Paulo, Brasil**. 2018. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

ZHANG, L. **et al.** Reassortant analysis of guinea pig virulence of pichinde virus variants. **Virology**, v.290, p.30-38, 2001.

ZHU, F. X.; CHONG, J. M.; WU, L.; YUAN, Y. 2004. Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Journal of Virology 79:800_811. (DOI 10.1128/JVI.79.2.800-811.2005), 2004.

ZIEMAN, J. C.; FOURQUREAN, J. W.; FRANKOVICH, T. A. Seagrass die-off in Florida Bay: Long-term trends in abundance and growth of turtle grass, *Thalassia tertudinum*. Estuaries 22(2B): 460-470, 1999.

ZWARG, T. **et al.** Hematological and histopathological evaluation of wildlife green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapilloma from the north coast of São Paulo State, Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 34, n. 7, p. 682-688, 2014.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Dados de tartarugas-verdes não acometidas para FP amostradas com sangue

								Sangue					Indivíduo
Animal	**FP**	**CCC**	**LCC**	**Massa**	**Nº Tamar**	**Coleta**	**Praia**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**Final**
UBA022	não	84,00	77,00	9,00	-	fev/14	Itaguá	N	N	N	N	N	**N**
UBA026	não	44,00	41,80	15,00	-	fev/14	Tabatinga	N	N	N	N	N	**N**
UBA027	não	41,30	37,80	7,50	TT1305/92562	fev/14	Cedro	P	P	P	N	P	**P**
UBA028	não	32,70	29,20	3,00	89919/TT1282	fev/14	Toninhas	N	P	N	N	P	**P**
UBA029	não	34,40	30,50	4,00	-	fev/14	Paraty	N	P	N	N	P	**P**
UBA030	não	40,30	37,30	6,00	92460	fev/14	Itaguá	N	P	N	N	P	**P**
UBA031	não	35,60	34,20	5,00	92561	fev/14	Enseada	P	P	P	N	P	**P**
UBA 032	não	35,70	32,10	4,00	92530/TT1302	fev/14	Vermelha do Centro	N	N	N	N	N	**N**
UBA033	não	53,30	50,00	15,00	-	-	Caraguatatuba	N	P	P	N	P	**P**
UBA037	não	39,50	34,40	5,00	94469/468	set/14	Cedro	P	P	N	N	P	**P**
UBA038	não	36,60	33,30	4,50	94426	set/14	Enseada	N	P	P	N	P	**P**
UBA039	não	31,20	28,70	3,00	-	-	Ilha do Mar Virado	N	P	N	N	P	**P**
UBA040	não	50,90	45,00	15,00	-	-	São Sebastião	N	P	N	N	P	**P**
UBA057	não	37,00	34,60	4,00	98155	mar/15	Praia Grande	N	P	P	N	P	**P**
UBA058	não	38,90	36,00	5,10	98185	mar/15	Vermelha do Centro	N	N	N	N	N	**N**
UBA059	não	35,80	33,50	5,00	98157	mar/15	Saco da Ribeira	P	P	P	N	P	**P**
SP001	não	41,30	38,50	8,60	BRA00478	fev/16	Itaguá	N	N	N	N	N	**N**
SP002	não	39,00		6,70	-	fev/16	-	N	N	N	N	N	**N**
SP003	não	29,00	26,80	2,70	BRA02527	fev/16	Perequê-açu	N	N	N	N	N	**N**
SP004	não	34,50	31,20	4,50	BRA02593	fev/16	Saco da Ribeira	P	N	N	N	P	**P**
SP005	não	32,00	30,40	4,10	BRA00475	fev/16	Enseada	N	N	N	N	N	**N**
SP006	não	44,70	40,00	10,00	BRA03439/38	fev/16	Camburi	N	N	N	N	N	**N**
SP008	não	45,50	41,70	11,00	BRA02507/06	fev/16	Bonete	N	N	N	N	N	**N**

APÊNDICE B – Dados de tartarugas-verdes acometidas para FP amostradas com sangue

											Sangue					Indivíduo
Animal	**FP**	**CCC**	**LCC**	**Massa**	**Nº Tamar**	**CC**	**FPI**	**FPS**	**Coleta**	**Praia**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**Final**
UBA008	sim	36,00	32,00	4,00	89464	Boa	22,4	leve	set/13	São Sebastião	N	P	P	N	P	**P**
UBA009	sim	39,50	35,50	6,00	89498	Boa	6,1	leve	set/13	Enseada	P	P	P	N	P	**P**
UBA010	sim	37,50	34,70		83995	-	-	-	set/13	Tenório	N	P	N	N	P	**P**
UBA011	sim	33,00	29,80	4,00	89397	Boa	-	-	set/13	Almada	N	P	P	N	P	**P**
UBA013	sim	41,00	36,50	6,50	86230	-	-	-	mar/13	Cruzeiro	N	N	N	N	N	**N**
UBA014	sim	33,00	29,80	4,00	89397/89935	-	-	-	jan/14	Itaguá	N	P	P	N	P	**P**
UBA015	sim	39,50	35,00	6,50	89323	-	-	-	jan/14	Itaguá	N	P	P	N	P	**P**
UBA016	sim	41,00	36,50	6,50	86230/8936	-	-	-	jan/14	Itaguá	N	P	N	N	P	**P**
UBA017	sim	38,10	35,50	6,00	89964	-	139,5	severo	jan/14	Itaguá	P	P	P	N	P	**P**
UBA034	sim	35,40	32,30	5,00	92521/TT1296	Boa	101	moderado	fev/14	Angra dos Reis	P	N	P	P	P	**P**
UBA035	sim	43,30	40,80	9,00	92452/TT1289	Boa	224,3	severo	fev/14	Itaguá	P	P	P	N	P	**P**
UBA036	sim	35,90	32,20	5,00	92531/TT1303	Boa	1,5	leve	fev/14	Itaguá	P	N	P	N	P	**P**
UBA041	sim	38,00	33,50	6,00	94278	Boa	74,6	moderado	set/14	Itaguá	P	P	P	N	P	**P**
UBA042	sim	40,60	35,70	8,00	94462/463	Boa	5	leve	set/14	Enseada	N	P	N	N	P	**P**
UBA043	sim	33,20	32,80	6,00	93538	Boa	144,4	severo	set/14	Estaleiro	P	P	P	N	P	**P**
UBA044	sim	57,20	53,90	23,50	94408	Boa	-	-	set/14	Cedro	N	P	N	N	P	**P**
UBA045	sim	48,20	43,10	15,00	94329	Boa	152,1	severo	set/14	Enseada	N	N	N	N	N	**N**
UBA060	sim	46,00	41,60	13,50	97967	Boa	12,1	leve	mar/15	Camburi	N	P	P	N	P	**P**
SP007	sim	54,20	49,80	18,00	BRA03429/28	Boa	-	-	fev/16	Camburi	N	N	N	N	N	**N**
SP009	sim	47,00	43,70	12,50	BRA034201	-	-	-	fev/16	Bonete	N	N	N	N	N	**N**
SP010	sim	38,60	34,60	7,00	BRA02580	Regular	-	-	fev/16	Almada	N	N	N	N	N	**N**
SP011	sim	41,50	38,70	8,00	BRA02506	Boa	-	-	fev/16	São Sebastião	N	N	N	N	N	**N**
SP012	sim	56,50	54,00	16,00	BRA02401	Ruim	-	-	fev/16	Camburi	P	N	N	N	P	**P**
SP013	sim	45,00	42,50	10,00	BRA00341	-	-	-	fev/16	Camburi	N	N	N	N	N	**N**
SP014	sim	49,50	44,70	12,80	BRA00214/15	-	-	-	fev/16	Camburi	P	N	N	N	P	**P**
SP015	sim	41,00	38,00	7,40	BRA02419	-	-	-	fev/16	Itamanbuca	N	N	N	N	N	**N**
SP016	sim	42,80	39,10	9,00	BRA02535	-	-	-	fev/16	Paraty	N	N	N	N	N	**N**

APÊNDICE C– Dados de tartarugas-verdes não acometidas pela FP amostradas com sangue e pele

									Sangue					Pele					Indivíduo
Animal	**FP**	**CCC**	**LCC**	**Massa**	**Nº Tamar**	**CC**	**Coleta**	**Praia**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**Final**
SU1	não	42,80	41,20	8,20	TT2194	bom	nov/18	Camburi	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	**N**
SU2	não	38,00	35,10	5,00	TT2251	regular	nov/18	Camburi	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	**N**
SU3	não	44,00	40,00	9,20	TT2230	bom	nov/18	Barra Seca	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	**N**
SU4	não	38,00	35,60	3,90	TT2261	ruim	nov/18	Domingas Dias	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	**N**
SU5	não	33,20	31,40	4,10	TT2196	regular	nov/18	Barra Seca	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	**N**
SU6	não	37,30	33,00	3,50	TT2259	ruim	nov/18	Ilha Bela	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	**P**
SU7	não	36,00	32,80	3,90	TT2263	ruim	nov/18	Ilha Bela	N	P	N	N	P	N	P	N	N	P	**P**
SU8	não	64,00	57,00	27,00	-	bom	nov/18	Enseada	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	**P**
SU9	não	34,50	31,60	5,00	TT2324	bom	abr/19	Lagoinha	N	N	-	N	N	N	N	-	N	N	**N**
SU10	não	41,40	40,90	6,70	TT2319	regular	abr/19	Enseada	N	P	-	N	P	N	P	-	N	P	**P**
SU11	não	37,00	34,50	4,90	TT2326	regular	abr/19	Enseada	N	P	-	N	P	N	P	-	N	P	**P**

APÊNDICE D– Dados de tartarugas-verdes acometidas pela FP amostradas com sangue e pele

										Sangue					Pele					Tumor					Indivíduo
Animal	**FP**	**CCC**	**Massa**	**Nº Tamar**	**CC**	**FPI**	**FPS**	**Coleta**	**Praia**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**Final**
SF1	sim	39,00	5,90	TT2239	regular	88,6	moderado	nov/18	Picinguaba	N	N	N	N	N	N	P	P	N	P	N	P	P	N	P	**P**
SF2	sim	38,90	7,50	TT2233	bom	39	leve	nov/18	Camburi	N	N	N	N	N	P	P	P	N	P	P	P	P	P	P	**P**
SF3	sim	49,50	14,00	TT2255	regular	257,9	severo	nov/18	Lázaro	P	N	N	N	P	P	P	P	N	P	N	P	P	N	P	**P**
SF4	sim	45,50	11,00	TT2246	bom	2,2	leve	nov/18	Camburi	N	P	N	N	P	N	P	P	N	P	P	P	P	P	P	**P**
SF5	sim	44,00	7,04	TT2323	regular	20,4	leve	abr/19	Peres	N	N	-	N	N	P	P	-	P	P	P	P	-	N	P	**P**
SF6	sim	46,30	11,50	TT2314	bom	41,8	moderado	abr/19	Enseada	N	N	-	N	N	N	N	-	N	N	nc	nc	nc	nc	nc	**N**
SF7	sim	36,70	5,10	TT2322	bom	29,2	leve	abr/19	Matarazzo	N	N	-	N	N	P	P	-	N	P	P	P	-	P	P	**P**
SF8	sim	41,00	5,70	TT2304	regular	24,6	leve	abr/19	Enseada	N	N	-	N	N	P	P	-	P	P	P	P	-	N	P	**P**
SF9	sim	37,00	4,60	TT2327	regular	3,7	leve	abr/19	Vermelha do Sul	N	N	-	N	N	P	N	-	P	P	P	P	-	P	P	**P**

Nota: nc, amostra não coletada.

APÊNDICE D – Dados de tartarugas-verdes não acometidas pela FP amostradas com pele, pulmões, gônadas, fígado e baço

								Pele					Pulmões					Gônadas					Fígado					Baço					Indivíduo
Animal	**FP**	**CCC**	**Massa**	**Sexo**	**CC**	**Coleta**	**Praia**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**Final**
P22	não	40,8	6,7	Fêmea	regular	2016	Itamambuca	*	*	-	*	P	*	*	-	*	P	P	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	P	N	N	P	**P**
P23	não	51,0	11,4	Fêmea	ruim	2016	Toninhas	*	*	-	*	P	*	*	-	*	P	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	P	N	N	P	**P**
P24	não	49,0	9,5	Macho	ruim	2016	Vermelha do Sul	*	*	-	*	N	*	*	-	*	P	N	N	N	N	N	P	P	N	N	P	N	P	N	N	P	**P**
P26	não	39,5	5,2	Fêmea	ruim	2016	Enseada	*	*	-	*	P	*	*	-	*	P	P	P	P	N	P	N	N	P	N	P	P	P	N	N	P	**P**
P27	não	46,5	12,0	Macho	bom	2016	Cedro	*	*	-	*	N	*	*	-	*	P	nc	nc	nc	nc	nc	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	**P**
P28	não	40,5	6,0	Fêmea	regular	2016	Lázaro	*	*	-	*	P	*	*	-	*	P	P	P	N	N	P	N	N	P	N	P	P	P	N	N	P	**P**
P29	não	41,0	7,0	Fêmea	regular	2016	Camburi	*	*	-	*	N	*	*	-	*	P	P	P	P	N	P	P	P	N	N	P	P	N	N	N	P	**P**
P38	não	33,5	4,2	Fêmea	bom	2016	Perequê-açu	*	*	-	*	N	nc	nc	nc	nc	nc	P	N	N	N	P	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	**P**
P40	não	41,4	5,3	Fêmea	ruim	2016	Perequê-açu	*	*	-	*	N	*	*	-	*	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	**P**
P41	não	35,7	3,6	Fêmea	ruim	2016	Ponta aguda	*	*	-	*	N	*	*	-	*	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	P	N	N	P	**P**
P42	não	42,2	7,2	Fêmea	regular	2016	São Sebastião	*	*	-	*	N	*	*	-	*	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	**P**
P48	não	31,0	2,6	Fêmea	ruim	2016	Barra Seca	*	*	-	*	N	*	*	-	*	P	P	P	N	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P	N	P	**P**
P49	não	48,9	7,9	Macho	ruim	2016	Picinguaba	*	*	-	*	N	*	*	-	*	P	N	P	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	N	N	P	**P**
P50	não	38,8	5,0	Fêmea	ruim	2016	Lagoinha	*	*	-	*	N	*	*	-	*	P	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	P	N	N	P	**P**
SN1	não	34,9	4,0	Fêmea	ruim	nov/18	Caraguatatuba	N	P	P	N	N	N	P	P	N	P	P	P	N	N	P	N	P	N	N	P	nc	nc	nc	nc	nc	**P**
SN2	não	34,5	2,6	Fêmea	ruim	nov/18	Lázaro	N	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	P	N	N	P	**P**
SN3	não	35,5	2,8	Fêmea	ruim	nov/18	Perequê-açu	N	P	P	P	P	N	P	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	P	P	N	N	P	**P**
SN4	não	38,0	3,9	Fêmea	ruim	nov/18	Domingas Dias	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	P	N	P	N	P	P	P	P	N	P	N	N	N	N	N	**P**
SN5	não	37,4	4,5	Fêmea	ruim	nov/18	Itaguá	N	P	P	N	P	N	P	N	N	P	N	P	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	**P**
SN6	não	37,3	3,5	Macho	ruim	nov/18	Ilha Bela	N	N	P	N	P	N	P	P	N	P	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	**P**

Nota: nc, amostra não coletada; *, resultado disponível no trabalho de Zamana (2016).

APÊNDICE E – Dados de tartarugas-verdes acometidas pela FP amostradas com pele, tumor, pulmões, gônadas, fígado e baço

										Pele				Tumor				Pulmões				Gônadas					Fígado					Baço					Indivíduo
Animal	**FP**	**CCC**	**Massa**	**Sexo**	**CC**	**FPI**	**FPS**	**Coleta**	**Praia**	**UL30**	**UL18**	**FUS**	**Final**	**UL30**	**UL18**	**FUS**	**Final**	**UL30**	**UL18**	**FUS**	**Final**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**UL30**	**UL18**	**UL27**	**FUS**	**Final**	**Final**
P25	sim	50,5	12,5	Fêmea	regular		leve	2016	Saco da Ribeira	*	*	*	P	*	*	*	P	*	*	*	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	**P**
P30	sim	44,5	10,5	Fêmea	ruim	116	moderado	2016	Barra Seca	*	*	*	P	*	*	*	P	*	*	*	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	**P**
P32	sim	56,5	16,3	Fêmea	ruim	20,9	leve	2016	Ilha Bela	*	*	*	P	*	*	*	P	*	*	*	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P	P	N	N	P	**P**
P33	sim	59,0	20,7	Fêmea	regular	212	severo	2016	Cedro	*	*	*	P	*	*	*	P	*	*	*	P	P	P	N	N	P	N	P	N	N	P	N	P	N	N	P	**P**
P43	sim	47,0	14,0	Fêmea	ruim	1,2	leve	2016	Almada	*	*	*	P	*	*	*	N	*	*	*	P	P	P	N	N	P	N	N	P	N	P	P	N	N	N	P	**P**
P44	sim	49,5	11,0	Fêmea	ruim	20,2	leve	2016	São Sebastião	*	*	*	N	*	*	*	P	*	*	*	P	P	P	N	N	P	nc	nc	nc	nc	nc	P	P	N	N	P	**P**
P45	sim	47,0	9,3	Fêmea	ruim	7,8	leve	2016	Praia do Léo	*	*	*	P	*	*	*	P	*	*	*	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	**P**
P46	sim	50,0	16,0	Fêmea	regular	174	severo	2016	Cedro	*	*	*	P	*	*	*	P	*	*	*	P	N	P	N	N	P	N	P	N	N	P	P	P	N	N	P	**P**
P47	sim	41,0	9,0	Fêmea	regular	6,1	leve	2016	Cedro	*	*	*	P	*	*	*	P	*	*	*	P	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	**P**
P1684	sim	36,3	4,2	Fêmea	ruim	30,6	leve	2016	Saco da Ribeira	*	*	*	P	*	*	*	P	*	*	*	P	P	P	N	N	P	P	P	N	N	P	P	P	N	N	P	**P**
AG1	sim	44,0	13,7	Fêmea	bom	3,6	leve	2017	Alcatrazes	*	*	*	P	*	*	*	P	*	*	*	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	**P**
AG2	sim	44,5	9,7	Fêmea	bom	0,3	leve	2017	Alcatrazes	*	*	*	P	*	*	*	P	*	*	*	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	**P**
AG3	sim	45,0	10,8	Fêmea	bom	0,2	leve	2017	Alcatrazes	*	*	*	N	*	*	*	P	*	*	*	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	**P**

Nota: nc, amostra não coletada; *, resultado disponível no trabalho de Zamana (2016).