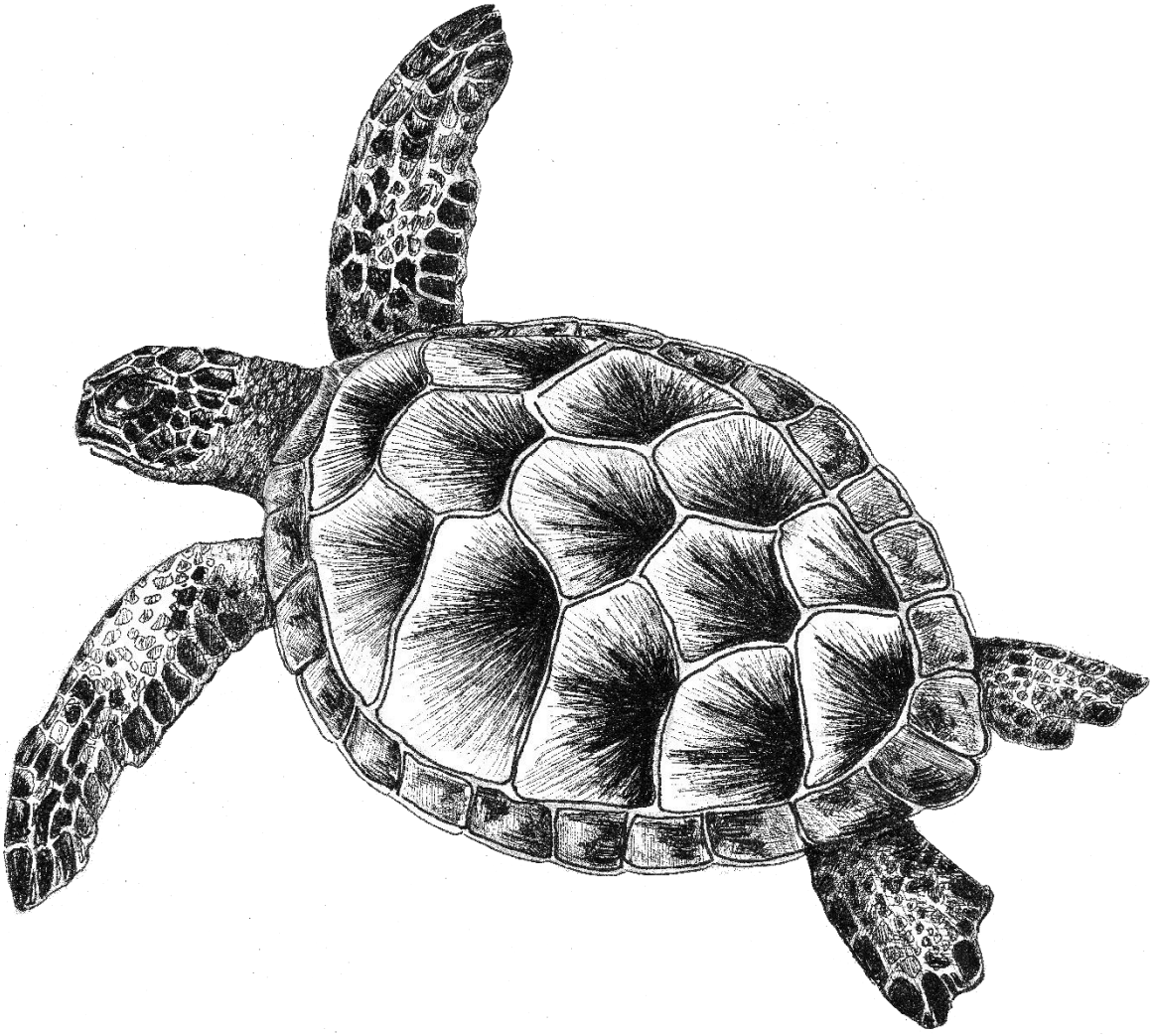
ROBERTA RAMBLAS ZAMANA

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.



São Paulo

2018

ROBERTA RAMBLAS ZAMANA

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.

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

2018

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. 3675
FMVZ

Zamana, Roberta Ramblas
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 / Roberta Ramblas Zamana. – 2018.
112 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima.

1. Fibropapilomatose. 2. Conservação. 3. Impacto. 4. Tumores. 5. Testudines. I. Título.

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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Detecção de Chelonid Herpesvirus (ChHV5) em Tartarugas Verdes (Chelonia mydas) no litoral brasileiro por hibridização in situ.", protocolada sob o CEUA nº 9465110716, sob a responsabilidade de **Eliana Reiko Matushima** *e equipe; Roberta Ramblas Zamana* - 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 23/11/2016.

We certify that the proposal "Detection of Chelonid Herpesvirus-5 (ChHV5) in Brazilian green sea turtles (Chelonia mydas) by in situ hybridization.", utilizing 50 Reptiles (males and females), protocol number CEUA 9465110716, under the responsibility of **Eliana Reiko Matushima** *and team; Roberta Ramblas Zamana* - 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 11/23/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 08/2016 a 08/2018 Área: Patologia Experimental E Comparada

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

Resumo: Considerando que o Chelonid Herpesvirus 5 (ChHV5) está presente nas lesões fibropapilomatosas e tem sido apontado como causa primária da fibropapilomatose (FP). Essa doença caracteriza-se por uma proliferação tumoral benigna do tecido epitelial que resulta em lesões que podem atingir grandes dimensões e prejudicar o indivíduo acometido pela FP, por interferir na natação, visibilidade e acesso a alimento. Animais acometidos podem apresentar anemia severa, hipoproteinemia, leucopenia e heterofilia, além de baixos valores de colesterol e triglicérides. Encontra-se pouco elucidado na literatura os mecanismos de infecção pelo Chelonid Herpesvirus 5 (ChHV5), a virulência deste agente, suas variantes, localização, estágios de vida e as taxas de mortalidade de Chelonia mydas decorrentes da FP. Devido a isso, esse projeto tem como proposta a detecção e localização do agente em tecido epitelial e tumores de Chelonia mydas acometidas e não acometidas pela FP por meio da técnica de hibridização in situ.

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

São Paulo, 28 de junho de 2018

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

#	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 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: 32636-9	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 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

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	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
6		SP	REFÚGIO 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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ZAMANA, Roberta Ramblas

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.

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:_____

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, a Matu, pela oportunidade, por todos os seus ensinamentos e pela paciência. Sem o seu apoio esse trabalho não seria possível, agradeço ainda por todos os momentos de descontração e convívio. Tenho uma imensa admiração profissional e pessoal por você e ter você como orientadora é uma realização profissional para mim. Muito obrigada por tudo.

Agradecimentos especiais à minha família: meus pais José Roberto e Suzete, por todo apoio em minhas decisões, por sempre acreditarem em mim e por terem compreendido os meus momentos de ausência, vocês são o meu melhor exemplo e meu amor por vocês é imensurável...À minha querida irmã, Rebeka pelo apoio, pelos momentos descontraídos, por ser minha melhor amiga e por sempre estar ao meu lado...À minha avó e tias por me receberem em São Paulo e me acolherem em suas casas...À minha prima Pamella, por ser minha companhia em São Paulo e por todos os momentos divertidos...À minha prima Fernanda, por todo apoio e amizade.

Agradeço às equipes do Projeto TAMAR de Ubatuba/SP e ICMBio Alcatrazes/SP, em especial à Dra. Silvia Neri Godoy, pelo fornecimento das amostras e por toda disponibilidade durante as coletas.

Agradeço à Dra. Juliana Guerra e sua equipe do Instituto Adolfo Lutz e ao Prof. Dr. Bruno Cogliati por todos os ensinamentos e por tornar possível a realização da técnica de hibridização *in situ.*

Sou muito agradecida aos amigos que fiz durante os estágios realizados no Projeto TAMAR em Ubatuba/SP, em especial, Vivian, Ester, Sergio, Jean, Paulinha, Barbara e Andrei. Obrigada por todo apoio e companhia.

Agradeço ao Projeto Karumbé e toda sua equipe pela experiência única que vivi com as tartarugas marinhas durante o estágio e por pessoas maravilhosas que conheci, em especial, minha querida amiga argentina Andre Porpatto, por toda a companhia e aventuras vividas e pelo apoio durante o mestrado. Jimena Landerretche por todos os ensinamentos e chocolates chilenos maravilhosos, proporcionais à sua doçura.

Meus agradecimentos a todos que me receberam de forma amável no LAPCOM, ao Jorge Oyakawa por toda ajuda, sábias palavras, companhia e preocupação. Pablo Cruz-Ochoa e Pedro Enrique Navas-Suárez, por

compartilharem seus conhecimentos histopatológicos e por toda ajuda durante o projeto, além da amizade. Eduardo Machado que gentilmente contribuiu nesse trabalho elaborando os mapas. Camila Molina pelas palavras gentis. Sândara Pimentel Sguario por toda ajuda com o histopatológico e principalmente pela amizade, pelos momentos divertidos compartilhados e pela companhia nos melhores almoços. Ana Carolina Ewbank por ser tão gentil comigo e por todas as contribuições acadêmicas. Carlos Sacristán por todos os ensinamentos de biologia molecular. Angélica Sánchez-Sarmiento por sua amizade. Marcelo Carvalho, por todo o apoio e ajuda durante o projeto e pelo exemplo de excelência.

Agradeço à Thaís Bisson, pela ajuda com as fotos e pela companhia agradável.

Meus sinceros agradecimentos à Danny Fuentes e Daniela Castron, queridos amigos, que me receberam em sua casa gentilmente e tornaram os momentos tensos da escrita mais fáceis. Muito obrigada pelo apoio, companhia e comidas chilenas maravilhosas.

Agradecimentos especiais aos meus colegas do grupo das tartarugas-marinhas: Isabela Silva, obrigada pela companhia. Fabiola Prioste, querida Fa, exemplo de profissional dedicada e pessoa maravilhosa, muito obrigada pelos ensinamentos, pela ajuda e por ser sempre tão carinhosa comigo. Silmara Rossi, Mara, obrigada por sempre me incentivar, por me ajudar em todos os momentos, por compartilhar todos os seus conhecimentos. Você possui um coração enorme, sempre vou levar comigo todos os nossos momentos divertidos, as aventuras em viagens e todos os seus valiosos conselhos. Além da admiração profissional, te admiro pela pessoa meiga, doce e linda que você é, ainda viveremos muitas coisas juntas e espero um dia poder retribuir tudo o que você fez por mim . Marco Aurélio Gattamorta, palavras não são capazes de traduzir o quanto você foi essencial para esse trabalho, você foi o responsável por todo o meu crescimento científico durante essa jornada. Muito obrigada, por estar sempre disponível para me ajudar, pela paciência e por aguentar minhas teimosias e inseguranças. Sem dúvida, você é um educador e pesquisador completo e aprender com você foi uma das melhores experiências da minha vida. As tartarugas-marinhas e eu, temos muita sorte de ter vocês.

Agradeço à minha amiga Gislaine Dalazen, a Gi, se é que somente a palavra amiga traduz tudo o que você representa para mim. Quando cheguei no LAPCOM,

você foi uma das primeiras pessoas que me acolheu da maneira mais amável possível e em pouco tempo já nos tornamos inseparáveis. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos, principalmente por tornar os momentos difíceis mais leves , por me acompanhar em todas as aventuras, por acreditar nas minhas loucuras e muitas vezes por ser minha razão. Por todas as conversas, por toda companhia nos experimentos, pelas músicas compartilhadas e por me fazer ter a certeza de que sempre vou ter alguém com quem eu posso contar. Sem você, essa jornada não teria tantos momentos agradáveis que sempre vou me lembrar. Obrigada por ser minha melhor amiga.

Agradeço imensamente à minha querida amiga Thalita Faita, por tudo que vivemos durante o estágio e pelos bons momentos compartilhados. Obrigada pelo apoio durante todo o mestrado, pela companhia nas disciplinas e por todos os ensinamentos. Esse sentimento de amizade e companheirismo que construímos em tão pouco tempo e que mesmo com a distância ele é nutrido, só me fez perceber o quanto você especial e o verdadeiro sentido da palavra amiga. Não posso deixar de agradecer por você ter me dado o melhor presente: ser dinda da Luna, o que despertou em mim uma nova forma de amor no momento que peguei essa pequenininha nos braços.

Agradeço à Profa. Dra. Luiza Ishikawa, por todo apoio durante a graduação, por me motivar a seguir esse caminho. Você é minha inspiração,

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida.

Por fim, agradeço as tartarugas-marinhas por serem fantásticas e por me despertarem os melhores sentimentos e me proporcionarem experiências inesquecíveis.

“Prezo insetos mais que aviões.
Prezo a velocidade das tartarugas
mais que a dos mísseis.
Tenho em mim um atraso de nascença.
Eu fui aparelhado para gostar de passarinhos.
Tenho abundância de ser feliz por isso.
Meu quintal é maior do que o mundo.”

Manoel de Barros

RESUMO

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.** [Detection of *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5) and histopathological characterization of fibropapillomas in green turtles (*Chelonia mydas*) from the north coast of São Paulo, Brazil.]. 2018. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A Fibropapilomatose (FP) é uma neoplasia reportada em todas as espécies de tartarugas-marinhas. Dentre as espécies, a tartaruga-verde apresenta a maior prevalência da doença, sendo assim considerada uma doença panzoótica emergente. A associação do *Chelonid alphaherpesvirus* 5 (ChHV5) à tecidos tumorais, demonstrada por inúmeros estudos moleculares, descreve como agente etiológico da FP o ChHV5. Entretanto, há um consenso de que a doença possui caráter multifatorial e sua patogênese não é elucidada. A detecção de ChHV5 em diferentes tecidos permite o monitoramento do vírus na região e contribui para a compreensão da epidemiologia e patogênese deste agente, auxiliando na gestão e conservação da espécie. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo a detecção de ChHV5 em amostras de *Chelonia mydas* (tartaruga-verde), acometidas e não acometidas pela FP, provenientes do Litoral Norte do Estado de São Paulo, através de técnicas moleculares e avaliação histopatológica. Foram avaliadas amostras de tumores (42 externos e um interno), pele (n=50) e pulmões (n=27) procedentes de 53 espécimes. A prevalência de ChHV5 nos indivíduos foi de 94,33% (50/53), observando a presença do vírus em todos os tipos de tecidos avaliados, e em indivíduos acometidos e não acometidos pela doença. A avaliação histopatológica demonstrou uma maior frequência de tecidos tumorais caracterizados como fibropapilomas, seguido por papilomas, fibromas e papiloma/fibropapiloma, e observou-se corpúsculos de inclusão intranucleares e degeneração balonosa em 5,26% (2/38) das amostras. Os resultados permitiram a formulação de hipóteses que podem contribuir para a compreensão de aspectos relacionados à patogênese da doença, forneceram dados de prevalência, auxiliando no monitoramento do agente na região estudada, e demonstraram a presença do vírus em pulmões de indivíduos não acometidos pela FP, não descrita em literatura.

Palavras-chave: Fibropapilomatose. Conservação. Impacto. Tumores. Testudines.

ABSTRACT

ZAMANA, R. R. **Detection of *Chelonid alphaherpesvirus* 5 (ChHV5) and histopathological characterization of fibropapillomas in green turtles (*Chelonia mydas*) from the north coast of São Paulo, Brazil**. [Detecção de *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5) e caracterização histopatológicas 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.

Fibropapillomatosis (FP) is a neoplastic disease reported in all marine turtle species. However, green sea turtles (*Chelonia mydas*) present the highest prevalence of FP, which is considered an emergent panzootic disease. The association between *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5) and FP tumors, demonstrated by several studies, describes this virus as the primary etiological agent. However, there is a consensus that FP has multifactorial cause, and its pathogenesis is still unclear. The detection of ChHV5, in different types of samples, allows its monitoring in the environment, and contributes to knowledge about its epidemiology and pathogenesis providing skills for sea turtle conservation issues. The aims of this study were to characterize the FP tumors and detect ChHV5 in samples of *C. mydas* specimens with and without FP, from north coast of São Paulo State, through histopathological and molecular analyzes. Samples of FP tumor (42 external and one internal), skin (n = 50) and lung (n = 27) were obtained from 53 specimens. The prevalence of ChHV5 was 94.33% (50/53), and this virus was detected in all types of analyzed samples from tumored and non-tumored individuals. According to histopathological analysis, the most FP tumors was characterized as fibropapillomas, followed by papillomas, fibromas, and papilloma/fibropapilloma. Ballooning degeneration with intranuclear inclusion bodies were observed in 5.26% (2/38) of the samples. The data generated in this study allow the elaboration of hypothesis that can contribute to elucidate the pathogenesis of FP and provide prevalence information helping in the monitoring of this etiological agent in the studied area. In addition, the results revealed the presence of ChHV5 in lung samples from specimens without FP, findings not yet reported in previous studies.

Keywords: Fibropapillomatosis. Conservation. Impact. Tumors. Testudines.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO DE LITERATURA 19

2.1 Filogenia, aspectos biológicos, ecológicos e conservação da tartaruga-verde (*Chelonia mydas*). 19

2.2 Agentes infecciosos e consequências na vida selvagem, em particular nas tartarugas-marinhas com enfoque na espécie *Chelonia mydas*. 25

2.3 Taxonomia, biologia e breve histórico dos herpesvirus com enfoque nos reptilianos. 28

2.4. Caracterização do ChHV5, aspectos etiológicos e prevalência da fibropapilomatose. 33

2.5 Persistência do ChHV5 em potenciais locais não cutâneos. 39

3 OBJETIVO GERAL 42

3.1 Objetivos específicos 42

4 MATERIAIS E MÉTODOS 43

4.1 Área de estudo, manejo e seleção das tartarugas 43

4.2 Obtenção dos dados biométricos 45

4.3 Obtenção das amostras de pele, pulmões e tumores. 45

4.3.1 Acometidos pela FP 46

4.3.2 Não acometidos pela FP 47

4.3.3 Visão geral das amostras obtidas com base na situação dos espécimes. 48

4.4 AVALIAÇÃO MOLECULAR 49

4.4.1 Preparação das amostras para extração de DNA 49

4.4.2 Extração de DNA 49

4.4.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) 50

4.4.4 Leitura e análise dos produtos da PCR 51

4.4.5 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos 51

4.4.6 Análises das sequências 51

4.4.7 Análise filogenética 51

4.4.8 Preparação da *probe* para hibridização *in situ* 52
4.4.9 Hibridização *in situ* 52
4.5 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....53

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 54

5.1 Espécimes.....54
5.2 AVALIAÇÃO MOLECULAR.....57
5.2.1 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) 57
5.2.1.1 Detecção de ChHV5 nas amostras de tumores externo e interno, pele e pulmões.....58
5.2.1.2 Prevalência de ChHV5 em indivíduos acometidos e não acometidos pela fibropapilomatose. 63
5.2.1.3 Detecção do ChHV5 em indivíduos: análise conjunta dos resultados referente aos tecidos estudados.....64
5.2.2 Caracterização molecular do ChHV5 67
5.2.3 Hibridização *in situ* 68
5.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....71
5.3.1 Tumores externos 71
5.3.2 Tumor interno 73
5.3.3 Pele 74
5.3.4 Pulmões 75

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 80

REFERÊNCIAS.....82

1 INTRODUÇÃO

A Fibropapilomatose (FP) é uma neoplasia reportada em todas as espécies de tartarugas-marinhas: tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) (SMITH; COATES,1938), tartaruga cabeçuda (*Caretta caretta)* (HARSHBARGER, 1991), *Lepidochelys kempii* (BARRAGAN; SARTI, 1994), tartaruga de pente (*Eretmochelys imbricata*) (D'AMATO; MORAES-NETO, 2000), tartaruga oliva (*Lepidochelys olivacea*) (AGUIRRE et al., 1999), *Flatback* (*Natator depressus*) (LIMPUS et al., 1993) e tartaruga de couro (*Dermochelys coriacea*) (HUERTA et al., 2002). Dentre as espécies, a tartaruga-verde apresenta a maior prevalência da doença, sendo considerada por alguns autores uma doença panzoótica emergente nessa espécie (WILLIANS et al., 1994; JONES et al., 2016).

O monitoramento da fibropapilomatose em diversas áreas do mundo tem demonstrado prevalências e comportamentos variados da doença (STACY, 2016). A prevalência no Brasil, quando comparada às populações estudadas em outras regiões, apresenta frequências de baixas a moderadas. O estado do Ceará, seguido por Rio Grande do Norte, Espirito Santo e Sergipe, apresentam as maiores prevalências da doença, variando de 13,52% a 32,59%, no período de 2000 a 2014. O estado de São Paulo apresenta, nesse mesmo período, a prevalência de 10,43% (BAPTISTOTTE, 2016).

A região litorânea do Estado de São Paulo é considerada uma importante área de alimentação e desenvolvimento da tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), com frequentes registros de captura incidental de indivíduos desta espécie (MARCOVALDI et al., 1998; MARCOVALDI; MARCOVALDI, 1999; GALLO et al., 2006).

A associação do ChHV5 a tecidos tumorais, demonstrada por inúmeros estudos moleculares, descrevem como agente etiológico da FP o *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5). Entretanto, há um consenso de que a doença possui caráter multifatorial e que sua patogênese não é elucidada. A literatura aponta dificuldades em estudos devido ao não sucesso da cultura e isolamento do vírus e pela detecção do ChHV5 em tartarugas-marinhas assintomáticas (ALFARO-NUNEZ; GILBERT, 2014).

Em relação aos herpesvirus, alguns aspectos biológicos desse agente devem ser considerados no curso clínico da doença. Eles são capazes de estabelecer

infecções latentes por um longo período de vida em seu hospedeiro, e uma série de fatores, dentre eles, ambientais e imunológicos, podem reativar a replicação do agente (STRAUSS; STRAUSS, 2008).

A detecção do ChHV5 através de técnicas moleculares em diferentes tecidos e fluidos corporais de tartarugas-verdes acometidas e não acometidas pela FP é recém descrita na literatura cientifica, inclusive no Brasil. Estes estudos sugerem transmissão direta da FP, além de diferentes tecidos como locais de persistência viral por infecção latente (GATTAMORTA, 2015; ALFARO-NUNEZ et al., 2016; MONEZI et al., 2016; CHAVES et al., 2017; PAGE-KARJIAN et al., 2017).

A literatura aponta que a infecção de *Chelonia mydas* pelo ChHV5 ocorre nas áreas de alimentação. Hipóteses sugerem que a manutenção do agente nessas áreas ocorre quando a presença de tartarugas-verdes infectadas é maior em relação às suscetíveis (GATTAMORTA, 2015).

Se tratando de conservação de espécies ameaçadas, as doenças são um importante risco para manutenção das populações *in situ* e *ex situ* (CAUGHLEY, SINCLAIR, 1994; ROSSI, 2014). A FP, sem dúvida, causa efeitos negativos nos níveis individuais e populacionais das tartarugas-verdes, embora esses efeitos sejam difíceis de quantificar (STACY, 2016).

A detecção de ChHV5 em diferentes tecidos permite o monitoramento do vírus na região e contribui para a compreensão da epidemiologia e patogênese deste agente, auxiliando na gestão e conservação da espécie, uma vez que a literatura relata a necessidade de estudos que possam contribuir na gestão da doença através de investigações (JONES et al., 2016). Essas investigações visam elucidar aspectos sobre a infecção pelo alphaherpesvirus, a virulência do agente, estágio de vida e taxas de mortalidade de *Chelonia mydas* decorrentes da FP.

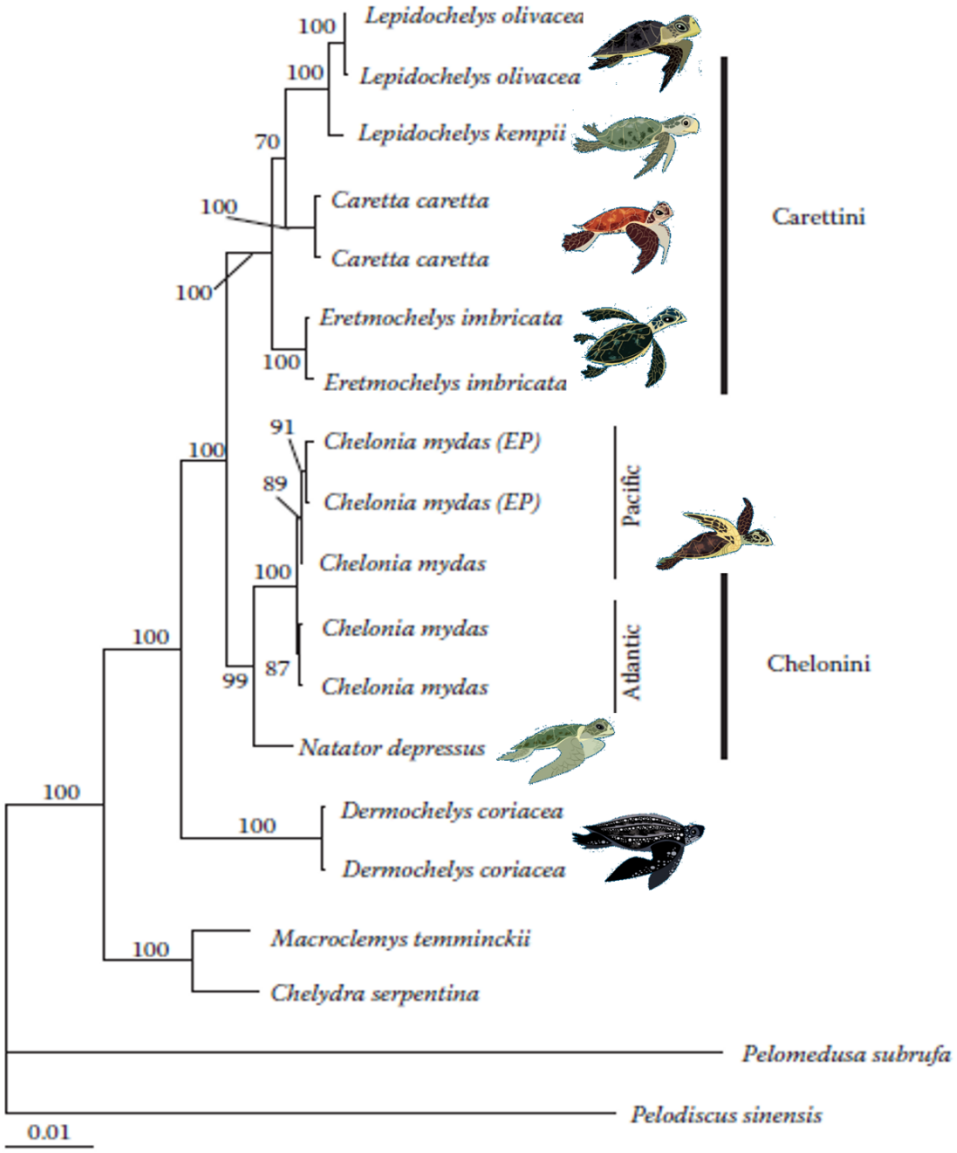
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Filogenia, aspectos biológicos, ecológicos e conservação da tartaruga-verde (*Chelonia mydas*).

Estudos baseados em marcadores mitocondriais e nucleares têm contribuído para avanços nas pesquisas no campo da filogenia, relação entre as linhagens das espécies de tartarugas-marinhas e sua posição nos Testudines. Atualmente, sete espécies de tartarugas-marinhas representadas por seis gêneros são reconhecidas, pertencentes à superfamília Chelonioidea e distribuídas nas famílias Cheloniidae (seis espécies) e Dermochelyidae (uma espécie), sendo que estas sobreviveram desde o Cretáceo até o presente (PRITCHARD, 1996; JENSEN; FITZSIMMONS; DUTTON, 2013).

Baseado na análise de 14 genes nucleares, Barley et al. (2010) demonstrou que a superfamília Chelonioidea forma um grupo monofilético que possui uma relação mais próxima com as tartarugas de água doce (Superfamília Kinosternoidea) e com os cágados (Família Chelydridae). De acordo com a máxima parcimônia e análises bayesianas de sequências de 980 pares de base (pb) de DNA mitocondrial (12S e 16S) e de 6350 pb de genes nucleares (BDNF, Cmos, R35, Rag1 e Rag2), as tartarugas-marinhas encontram-se subdivididas em duas subfamílias: a Chelonini (*Chelonia mydas* e *Natator depressus*) e Carettini (*Lepidochelys olivacea*, *Lepidochelys kempi*, *Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*), sendo que a única representante da família Dermochelydae, a espécie *Dermochelys coriacea*, ocupa a posição basal, representando a linhagem mais antiga quando comparada com as demais espécies (Figura 1) (NARO-MACIEL; FITZSIMMONS; AMATO, 2008; JENSEN; FITZSIMMONS; DUTTON, 2013).

Figura 1. Filogenia das tartarugas-marinhas baseada na máxima parcimônia (MP) e análises bayesianas de sequências de 980pb de DNA mitocondrial combinadas com 6350pb de genes nucleares (BDNF, Cmos, R35, Rag1, Rag2). Os números acima dos ramos são os valores de *bootstrap* da MP.

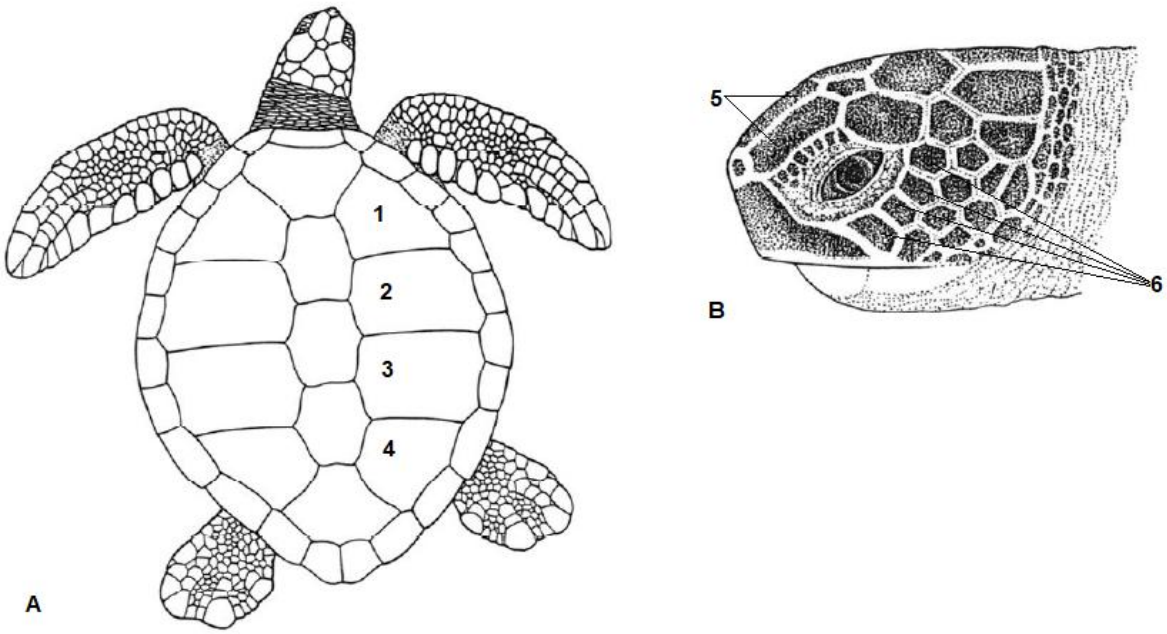


Fonte: Adaptado de Jensen; Fitzsimmons; Dutton, 2013.

A tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) apresenta distribuição circunglobal, ocorrendo nos mares tropicais (HIRTH, 1997). A espécie é caracterizada por possuir carapaça com quatro placas laterais justapostas e de coloração verde-acinzentada. No entanto, apresenta variações. A cabeça é constituída por um par de escudos pré-frontais e quatro pares de escudos pós-orbitais (MARQUEZ, 1990; PRITCHARD; MORTIMER, 1999) (Figura 2). Há duas populações principais: as do Oceano Pacífico e as do Oceano Atlântico (MARQUEZ, 1990). Segundo Duchene et al. (2012), o tempo de divergência entre essas duas linhagens está estimado em 3,09

milhões de anos (1,76-4,87). Os animais encontrados no Oceano Atlântico e no Oceano Pacífico oriental podem chegar a 230kg, sendo observados animais mais leves no Oceano Índico e no Caribe. Os filhotes dessa espécie são diferenciados dos demais por possuírem o ventre branco (PRITCHARD; MORTIMER, 1999).

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



Fonte: Adaptado de Pritchard; Mortimer (1999).

A história de vida da tartaruga-verde é única e complexa (MEYLAN; BOWEN; AVISE, 1990). Elas apresentam uma mudança ontogenética de onívoros, durante a fase pelágica (20 a 30 cm de comprimento retilíneo de carapaça), para herbívoros, quando chegam a áreas costeiras (MORTIMER., 1982; BJORNDAL.,1997; MEYLAN; MEYLAN., 2000; LIMPUS; LIMPUS., 2000; BOLTEN, 2003; ARTHUR; BOYLE; LIMPUS, 2008). Esta fase pelágica também é referida como “anos perdidos”, em que o comportamento da espécie não é bem conhecido (BOLTEN, 2003). Durante um determinado tempo, a tartaruga-verde pode residir ao longo da costa, demonstrando fidelidade ao local e retornando a áreas específicas para forrageamento. Essas áreas são deixadas quando os indivíduos se tornam adultos e iniciam as migrações de reprodução (CHALOUPKA; LIMPUS; MILLER, 2004; LIMPUS et al., 2005).

As migrações de reprodução por longas distâncias ocorrem após um longo período nessas áreas de forrageio e alimentação. No caso de fêmeas, particularmente, essa migração ocorre em direção ao local onde nasceram, comportamento denominado filopatria (CARR; CARR; MEYLAN, 1978). Esse comportamento passou a ser comprovado a partir do desenvolvimento das técnicas de investigações moleculares na década de 1990. Bowen et al. (1992) determinou, através da utilização do DNA mitocondrial como marcador molecular, a assinatura genética clara entre as diferentes áreas de reprodução, caracterizando assim os haplótipos das tartarugas-marinhas. Com isso, inúmeros trabalhos foram realizados evidenciando esse comportamento não somente na espécie *Chelonia mydas*, mas também nas demais espécies de tartarugas-marinhas. Assim, é possível observar a composição heterogênea das áreas de alimentação com a presença de diversos haplótipos constituindo o estoque misto dessas áreas (LAHANAS et al., 1994; ENCALADA et al., 1996; NARO-MACIEL et al., 2007, 2012; JENSEN., FITZSIMMONS., DUTTON, 2013.)

Estudos determinaram a composição de haplótipos presentes nas áreas de alimentação na costa brasileira, revelando que em Ubatuba/SP o haplótipo frequente é o CM-A8, seguido pelo CM-A5 e com menor presença dos haplótipos CM-A1, CM-A3, CM-A6 e CM-A9. O haplótipo mais comum CM-A8 está relacionado aos das populações de Trindade/BR, Ascensão/UK, Atol das Rocas/BR, Bioko/GEK e Guiné Bissau/ África, enquanto o haplótipo CM-A5 está relacionado aos haplótipos das populações de tartarugas-verdes encontradas nas áreas de reprodução do Suriname, Venezuela e Costa Rica. Esses estudos associaram essa composição de haplótipos presentes em áreas de alimentação da costa brasileira com as áreas de reprodução do Atlântico Sul, assim confirmando a participação dos haplótipos na composição dos estoques mistos das áreas de alimentação (JORDÃO, 2013; NARO-MACIEL et al., 2007,2012).

A tartaruga-verde atinge a maturidade sexual em média entre 25 e 50 anos, ou seja, mais tarde do que as demais espécies de tartarugas-marinhas. Relaciona-se a isso o comportamento de herbivoria e, consequentemente, um crescimento mais lento (CHALOUPKA; LIMPUS; MILLER, 2004). Durante o processo reprodutivo e de ovoposição, somente as fêmeas visitam as praias. Em uma única estação reprodutiva, podem ser formados de um a sete ninhos, cada um contendo cerca de 110 ovos. Entre os intervalos de desova, as fêmeas passam geralmente de 12 a 14

dias no oceano e raramente desovam no ano seguinte, podendo retornar a desovar após quatro a seis anos (SPOTILA, 2004).

No Brasil, as principais áreas (do litoral sul ao nordeste) de alimentação e reprodução das cinco espécies de tartarugas-marinhas que ocorrem na costa são monitoradas pelo Projeto TAMAR. Devido ao hábito alimentar, já citado anteriormente, tartarugas-verdes juvenis são comuns na região costeira do mar continental do Brasil e, de fato, esta é a espécie com maior número de registros de ocorrências (encalhes, avistagens e capturas incidentais). 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 e alguns registros, ainda que raros, nos estados do Rio Grande do Norte, Sergipe, Espírito Santo e Rio de Janeiro (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011a).

Os *status* internacional e nacional do estado de conservação da tartaruga-verde indicam respectivamente que a espécie está classificada como em perigo (IUCN, 2004) e vulnerável (ALMEIDA et al., 2011); no entanto, a comunidade científica debate sobre a relevância dessas avaliações, visto que podem não demonstrar a realidade das populações locais e regionais (GODFREY; GODLEY, 2008). As principais ameaças à sobrevivência das espécies de tartarugas-marinhas estão associadas a inúmeros fatores: destruição de habitats; ações antrópicas nas praias de nidificação (BUGONI; KRAUSE; PETRY, 2001); atividades pesqueiras; alterações climáticas; desenvolvimento costeiro; patógenos; consumo e uso de carapaça, carne e ovos (MAST et al., 2005); e, por fim, doenças como a fibropapilomatose (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011b). Dentre as ameaças, a captura incidental é reconhecida como fator de alta mortalidade e danos para as tartarugas-marinhas (ORAVETZ, 2000), sendo responsável pelo declínio de populações de uma maneira devastadora (MARCOVALDI; THOMÉ, 2000). Apesar dos esforços para conservação da tartaruga-verde, a demografia das espécies nas áreas de alimentação permanece pouco compreendida (SEMINOFF et al.,2003), sendo que populações da espécie têm sido esgotadas pela exploração, resultando no preocupante fato de que possam estar globalmente em perigo (CHALOUPKA et al., 2008).

Na conservação das tartarugas-marinhas, incluindo no Brasil, doenças estão entre as ameaças à sobrevivência das espécies. Hamann et al. (2010), citou a FP

na lista de prioridades para estudos na área de conservação, o que retrata a importância de pesquisas, em particular na tartaruga-verde, por ser a espécie mais acometida pela doença (HERBST et al., 1998; MATUSHIMA et al., 2001; SANTOS et al., 2010; TAGLIOLATTO et al., 2016). Um recente trabalho realizado em Ubatuba, litoral Norte de São Paulo, investigou achados macro e microscópicos de tartarugas-verdes. Nesse estudo, observou-se a grande quantidade de animais acometidos pela presença de parasitas, principalmente da família Spirorchiidae e suas consequentes alterações, além de achados sugestivos de infecções por agentes bacterianos e evidências de resíduos antropogênicos associados a constipações ou obliterações do trato gastrointestinal, em uma prevalência de 30,61% (15/49) de animais acometidos pela FP (CRUZ-OCHOA, 2017).

A literatura sobre a saúde de tartarugas-verdes relata valores de referência que podem contribuir para a determinação desta e se tornarem uma ferramenta para a tomada de decisões durante a reabilitação e liberação dos animais (BOLTON; BJORDNAL, 1992; AGUIRRE et al., 1995; SAMOUR et al., 1998; HASBUN et al., 1998; HAMMAN et al., 2006; FLINT et al., 2010a; FONG et al., 2010; LABRADA et al., 2010; OSBORNE et al., 2010; ANDERSON et al., 2011; HIRAMA et al., 2014; LEWBART et al., 2014). Estes valores de referência são valores hematológicos e bioquímicos que determinam o estado fisiológico dos animais, baseado em estudos e até mesmo na extrapolação de dados obtidos em outras condições, como em cativeiro (SANTOS et al., 2009). No entanto, a variação entre estes podem ocorrer em tartarugas saudáveis, de acordo com a localização geográfica, habitat, genética, maturidade, sexo e dieta (HERBST; JACOBSON, 2003; STAMPER et al., 2005; DEEM et al., 2006; HAMANN et al., 2006; WHITING et al., 2007), e poucos estudos combinam esses parâmetros para uma mesma subpopulação geográfica, utilizando esses resultados para identificar espécimes não saudáveis. (FLINT et al., 2010a; LEWBART et al., 2014).

Santos et al. (2015) realizou um estudo comparando parâmetros de saúde de tartarugas-verdes acometidas e não acometidas pela FP no Espírito Santo, litoral Sudeste brasileiro. Nesse estudo, ao comparar o índice de condição corporal com outros parâmetros, todos os animais com baixo índice estavam severamente acometidos pela FP, além de urêmicos, hipoglicêmicos e anêmicos em relação a animais classificados como saudáveis. No entanto, a avaliação clínica e parâmetros bioquímicos indicaram que a maioria dos animais acometidos pela FP estavam em

boas condições de saúde. Rossi et al. (2016) desenvolveram um método para avaliar a manifestação clínica da FP, através de um índice que avalia a fibropapilomatose no Atlântico Sul (FPI). A utilização desse índice em programas de monitoramento e em outros estudos visando a comparação entre animais saudáveis e não saudáveis, acometidos e não acometidos pela FP, pode auxiliar a avaliar os esforços na conservação, na compreensão sobre os fatores ambientais que modulam o desenvolvimento da FP, e seus impactos na saúde individual e populacional das tartarugas-verdes de diferentes áreas geográficas, visto a variação nesses parâmetros citados na literatura e a importância do uso de ferramentas científicas para a conservação da espécie.

2.2 Agentes infecciosos e consequências na vida selvagem, em particular nas tartarugas-marinhas com enfoque na espécie *Chelonia mydas*.

O termo extinção em massa é definido por paleontologistas como o momento em que ocorre a perda de ¾ das espécies presentes na Terra em um curto intervalo geológico, o que aconteceu somente cinco vezes nos últimos 540 milhões de anos. Dadas as perdas de espécies conhecidas nos últimos poucos séculos e milênios, cientistas sugerem que estamos vivenciando a sexta extinção. As observações descritas por estudos indicam que essa sexta extinção está sendo causada pelos humanos, através da captação de recursos, fragmentação de habitats, introdução de espécies, dispersão de patógenos, morte de espécies diretamente e mudança do clima global. De acordo com a literatura, temos a ciência de que a recuperação da biodiversidade não ocorrerá em nenhum período de tempo significativo para os humanos, visto que são necessárias centenas de milhares de anos para a evolução de novas espécies e a recuperação de episódios de extinção em massa ocorre em escalas de tempo de milhões de anos. Com base na abordagem do estudo aqui citado, de 2011, já era suposto pelos pesquisadores que a Terra pode chegar a essa perda extrema dentro de poucos séculos se as ameaças atuais a muitas espécies não forem atenuadas (BARNOSKY et al., 2011).

Doenças infecciosas emergentes (EIDs) são, por definição, aquelas que tiveram recente aumento na incidência ou no alcance geográfico, recente surgimento em novas populações, ou foram recém descobertas / causadas por patógenos que evoluíram (LEDERBERG; SHOPE; OAKES, 1992; DASZAK; CUNNINGHAM;

HYATT, 2000). Assim, englobam uma série de enfermidades humanas que constituem uma ameaça à saúde pública. De acordo com o estudo de Daszak; Cunningham; Hyatt (2001), a definição utilizada para doenças humanas pode ser utilizada para identificar um grupo similar de doenças em animais selvagens, em que as circunstâncias que levam à emergência de doenças nas populações humanas são semelhantes às que causam esse resultado em populações selvagens.

Estudos de 1998 e 1999 relataram que doenças em ambientes marinhos tiveram um aumento de incidência (EPSTEIN, 1998; HARVELL et al., 1999), sendo esse aumento resultado de atividades humanas. Dentre essas doenças, pode-se citar as de corais (HAYES; GOREAU, 1998; HARVELL et al., 1999), relacionadas à poluição marinha (PORTER; LEWIS; PORTER, 1999); a mortalidade de sardinhas, causada por um herpesvirus na Austrália e na Nova Zelândia, resultado da introdução do patógeno por atividades humanas (WHITTINGTON et al., 1997); e as mortes de mamíferos marinhos causadas por morbillivirus, que pode ter sido resultado da migração forçada de animais infectados após o esgotamento de seus recursos alimentares em decorrência da pesca, disseminando o agente (DIETZ et al.,1989; HEIDEJORGENSEN et al., 1992). As doenças infecciosas emergentes são responsáveis por impactos que podem levar a extinções locais (população) e globais (espécie), além de mortalidade em massa, resultando em perda da biodiversidade decorrente do efeito em cadeia causado por essas enfermidades (CUNNINGHAM; DASZAK, 1998; DASZAK; CUNNINGHAM, 1999).

As tartarugas-marinhas são um componente integrado do ambiente marinho e muitas populações continuam em declínio (CHALOUPKA; LIMPUS, 2001; CHAN, 2006). Como já citado no tópico anterior, esse declínio pode ser decorrente de ações humanas no entanto, é possível observar que as populações que não estão em contato direto com as intervenções humanas também se encontram em declínio, o que pode ser consequência de causas naturais (parasitas, doenças, predação) e, em muitos casos, é impossível definir a causa de morte (achados inconclusivos e estágios avançado de decomposição) . Diante disso, para melhor compreensão da influência das doenças na sobrevivência das tartarugas-marinhas, maiores informações sobre vias de transmissão, prevalência, infectividade e fatores em potencial são necessários para a compreensão da interface entre o ambiente e a saúde desses animais (FLINT, 2013).

A literatura científica descreve os principais agentes causadores de enfermidades nas tartarugas-marinhas e sugere que as doenças nesses animais possuem caráter multifatorial. Em relação ao parasitismo, dois grupos predominantes estão associados a doenças, levando à morte desses animais: Spirorchiidae e *Caryospora cheloniae* (FLINT et al., 2010b). Além disso, há relatos de agentes infecciosos, como bactérias (*Vibrio*, *Aeromonas*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Flavobacterium*, *Clostridium* e *Mycobacterium*) (CLARY; LEONG, 1984; OBENDORF; CARSON; McMANUS, 1987; GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990; GREER; STRANDBERG; WHITAKER, 2003; McARTHUR, 2004), fungos (*Colletrotrichium acutatum*, *Candida*, *Penicillium lilacinum*, *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Paecilomyces*, *Aspergillus* e *Fusarium* spp.) (OROS et al., 2004; FLINT et al., 2009), doenças como a fibropapilomatose (herpesvirus) e alguns agentes com potencial zoonótico (*Vibrio* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Mycobacterium* spp.) (GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990). Em 74 tartarugas-verdes, 28 espécies de trematódeos digenéticos foram encontradas, além de espécies de Protozoa como coccidia, flagelados e *Entamoeba* (FLINT, 2013).

Estudos experimentais e teóricos demonstraram que parasitas podem atuar na regulação de populações, afetando a condição corporal, fecundidade e sobrevivência do hospedeiro, o que pode levar à redução drástica das populações e, somado a isso, torná-las vulneráveis a eventos estocásticos que podem resultar na extinção destas (TOMPKINS et al., 2001). Além disso, infecções persistentes possibilitam a transmissão vertical, latência, manutenção de reservatórios e disseminação. Nestes casos, determinar os efeitos da infecção na dinâmica da população inclui quantificar as taxas de reprodução e sobrevivência. Esses parâmetros são difíceis de serem determinados em populações de vida livre devido à complexidade da história de vida desses animais e à dificuldade de monitoramento em seu habitat natural. Sendo assim, pesquisadores sugerem o uso de modelos matemáticos preditivos para melhor entendimento da dinâmica de agentes infecciosos na vida selvagem e na regulação de populações, levando em consideração fatores ambientais, genéticos e imunológicos (GRENFELL; DOBSON, 1995).

2.3 Taxonomia, biologia e breve histórico dos herpesvirus com enfoque nos reptilianos.

Os herpesvirus são morfologicamente distintos dos demais vírus. Apresentam genoma linear de cadeia dupla, com tamanho em média de 125-290 kp, englobado por um capsídeo icosaédrico, envolto por uma matriz proteica denominada tegumento e por um envelope lipídico contendo proteínas de membrana associadas. De acordo com o estudo de 2009, baseado na classificação ICTV (*International Comittee on Taxonomy of Viruses*- Comitê Internacional de Taxonomia Viral), a família Herpesviridae, que compreendia todos os herpesvirus, foi dividida em três famílias (Alloherpesviridae; Herpesviridae; Malacoherpesviridae) que compõem a Ordem Herpesvirales. A família Herpesviridae, subdividida em três subfamílias (Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae, Gammaherpesvirinae), apresenta os vírus de mamíferos, aves e répteis (DAVISON et al., 2009; ICTV, 2017).

Baseado em análises filogenéticas, pode-se concluir que os herpesvirus co-evoluíram, em grande maioria unidos à coespeciação. A subfamília Alphaherpesvirinae contém quatro gêneros, além do herpesvirus de répteis. Em termos de evolução, de acordo com a captura e duplicação gênica, os Alphaherpesvirinae possuem menor divergência evolutiva desde a diferenciação de um ancestral comum, sendo a perda de genes aparente, em que poucos são específicos de alguns vírus ou estão intimamente relacionados (DAVISON et al., 2009; ICTV, 2017).

Todos os herpesvirus são capazes de estabelecer infecção latente em seu hospedeiro natural, persistindo pela vida do animal. A infecção latente é estabelecida em um conjunto específico de células não permissivas ou semi-permissivas para o crescimento do vírus. Esta capacidade de latência resulta num conjunto de restrições e oportunidades para a propagação dos herpesvirus na natureza. Em geral, essas infecções são mantidas em tecido nervoso, normalmente neurônios. Durante a replicação viral, denominada também de ciclo lítico, um conjunto de células diferentes são infectadas. Assim, partículas virais capazes de infectar outros hospedeiros são liberadas. Esta fase normalmente é fatal para as células infectadas, e geralmente ocorre em células epiteliais. A latência pode ser quebrada por uma série de fatores, como a exposição à radiação UV, estresse e alterações hormonais. Ao ser quebrada, ocorre a migração do vírus até o axônio que

serve a um conjunto de células epiteliais e, nessas células permissivas, inicia-se o ciclo lítico (STRAUSS; STRAUSS, 2008).

O ciclo de infecção dos vírus começa com sua ligação a um receptor expresso na superfície de uma célula, seguido de penetração do genoma no citoplasma, geralmente acompanhado de uma proteína. A ligação ocorre em uma série de etapas e, em grande parte, o vírion se liga a receptores (glicoproteínas, glicolipídeos ou glicosaminas) que estão presentes na superfície das células susceptíveis do hospedeiro. Os herpesvirus, em sua maioria, utilizam receptores para facilitar a entrada do vírus nas células, podendo utilizar mais de um receptor. Assim, ao serem liberados, os vírions são capazes de infectar outras células, através dessas ligações específicas. Após a ligação, ocorre a fusão da membrana viral com as membranas das células infectadas, mediada pelas glicoproteínas do envelope. Então, o nucleocapsídeo é formado e transportado pelos poros nucleares, chegando ao núcleo, onde ocorre a replicação do DNA viral (STRAUSS; STRAUSS, 2008).

Os *Herpes simplex Tipo-1* (HSV-1) e *Herpes simplex Tipo-2* (HSV-2) foram os primeiros herpesvirus humanos a serem descobertos e estão entre os mais estudados na literatura. Em consequência disso, são referências entre os herpesvirus, sendo utilizados como parâmetro de esclarecimento e/ou comparação nos estudos sobre o assunto (MONEZI, 2016). Os herpesvirus codificam mais de 70 proteínas – a replicação acontece no núcleo, onde ocorre a codificação de enzimas que estão envolvidas no metabolismo do ácido nucléico. De acordo com os estudos dos sorotipos HSV-1 e HSV-2, a infecção primária é estabelecida quando um indivíduo soronegativo entra em contato com o vírus, geralmente proveniente de um hospedeiro que está secretando o vírus no momento. Sendo assim, um hospedeiro com uma infecção reativada pode servir como fonte de infecção, mas o vírus pode ser secretado ativamente, mesmo na ausência de lesões. A infecção aguda é acompanhada pela formação de lesões, que são os locais de replicação viral. No caso do HSV-1, as lesões são normalmente encontradas na região facial e mucosa oral e a infecção latente é estabelecida no nervo trigêmeo, enquanto que o HSV-2 é sexualmente transmissível, infectando a área genital e estabelecendo latência no nervo ciático. Os herpesvirus possuem estratégias que permitem a fuga do sistema imune através de produtos dos seus genes que são capazes de suprimir a apoptose, possibilitando a produção prolongada de vírions antes da resposta antiviral e do

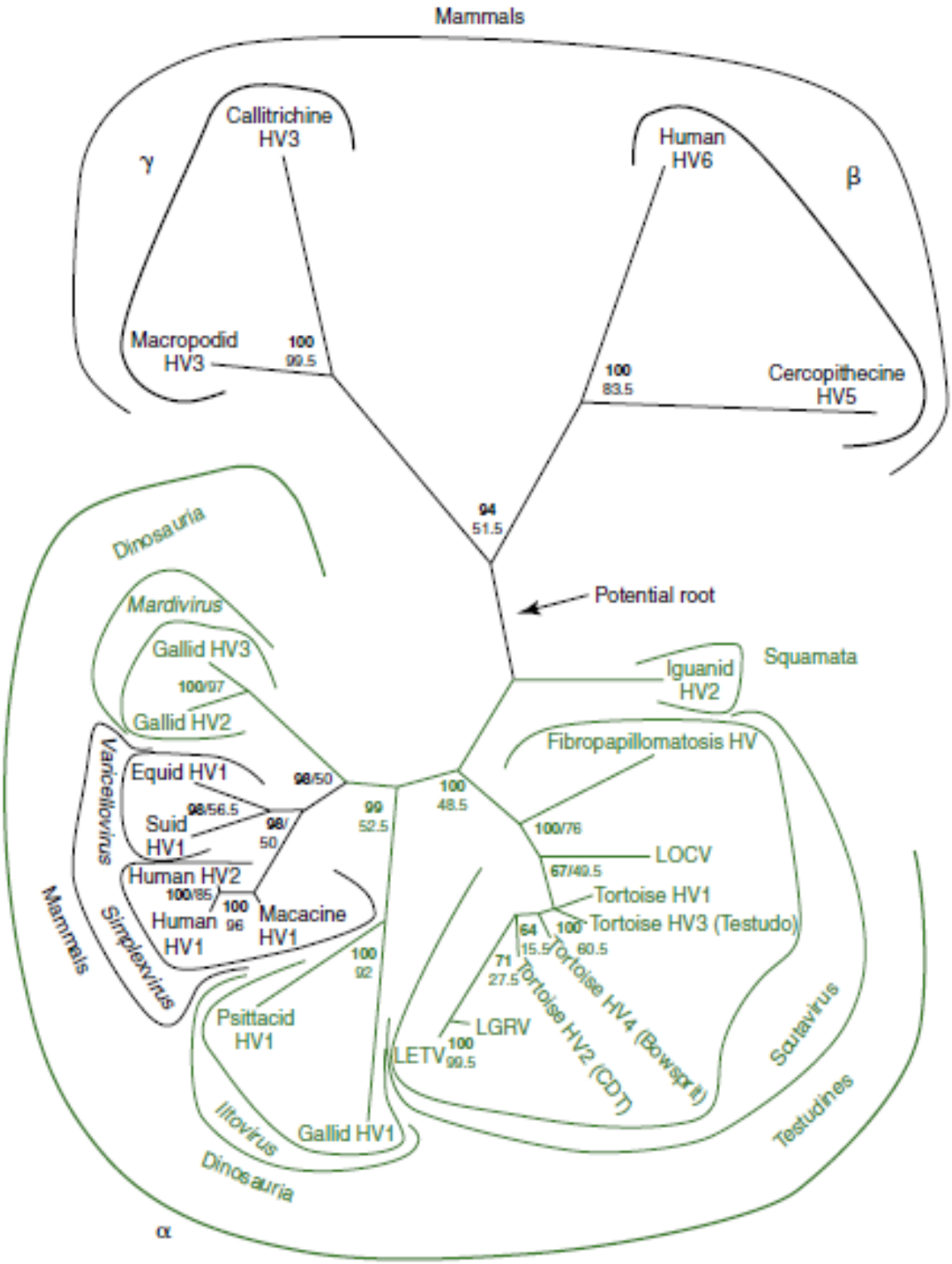
estabelecimento da latência. Isso possibilita a persistência do vírus, mesmo na ausência da reativação (STRAUSS; STRAUSS, 2008).

Dos dez vírus pertencentes ao gênero *Macavírus* e à subfamília Gammaherpesvirinae, os quais compõem o grupo de agentes da febre catarral maligna, dois são responsáveis por surtos economicamente importantes: *herpesvirus ovino tipo 2* (OvHV-2) e *Alcelaphine herpesvirus I* (AlHV-1). Os sinais clássicos em bovinos domésticos são: febre, descarga oculonasal, panoftalmite, linfadenopatia generalizada, inflamação e necrose em tratos digestório, respiratório e urinário, dermatite, sinais neurológicos e artrite, sendo que sua patogênese envolve respostas imunes desreguladas em ruminantes suscetíveis. Estudos com infecções experimentais demonstraram que, no caso da infecção em ovinos pelo OvHV-2, o trato respiratório inferior foi o principal alvo em infecções via aerossóis, ocorrendo replicação viral no epitélio alveolar, principalmente em pneumócitos do tipo II, não estabelecendo infecção através das vias intraperitoneal e intravenosa (O'TOOLE; LI, 2014). Em equinos (Herpesvirus tipo 1- EHV-1) e bovinos (Herpesvirus tipo 5- BoHV-5), alphaherpesvirus são responsáveis por quadros de meningoencefalites e sua patogênese é estudada em infecções experimentais, observando-se alterações pulmonares e neurológicas (MESQUITA et al., 2017a; MESQUITA et al., 2017b).

Como citado anteriormente, há evidências de que os herpesvirus co-divergiram evolutivamente com seus hospedeiros. Dando enfoque aos répteis, na árvore filogenética apresentada na Figura 3 há uma raiz em potencial (seta Figura) que representa um herpesvirus ancestral em um amniota ancestral. A divergência dos amniotas mais antiga é entre mamíferos e répteis. Todos os membros conhecidos das subfamílias Betaherpesvirinae e Gammaherpesvirinae utilizam mamíferos como hospedeiros e os comprimentos mais longos dos ramos na árvore filogenética indicam que esses vírus divergiram durante um longo período. Em direção a Alphaherpesvirinae, os Squamatas são a primeira divergência dentro dos répteis, seguidos pelo Scutavirus, infectando tartarugas. Em relação aos crocodilianos, não há sequências de herpesvirus disponíveis que permitam essa comparação. Os Mardivirus e os Itovirus infectam aves; no entanto, há alphaherpesvirus de mamíferos que infectam aves. O comprimento relativamente curto dos ramos dentro dos alphaherpesvirus de mamíferos sugere que esses vírus não divergiram um do outro na mesma medida que os herpesvirus de mamíferos.

Uma explicação para isso seria que essas herpesviroses representam um salto evolutivo de Dinosauria para mamíferos (JAMES; WELLEHAN, 2014).

Figura 3 - Árvore filogenética dos Herpesviridae. Em verde, destaca-se os herpesvirus dos répteis.



Fonte: James; Wellehan, 2014.

Ainda sobre répteis, na ordem Crocodylia há dois relatos de infecções por herpesvirus: *Crocodylus porosus* (McCOWAN; SHEPHERDLEY; SLOCOMBE, 2004), na Austrália, e *Aligator mississippiensis,* na Carolina do Norte (EUA) (JOHNSON et al., 2005a; GOVETT et al., 2005). Na ordem Sauria, a literatura descreve enfermidades ocasionadas por herpesvirus, como: papilomas em lagartos mais comumente encontrados na espécie *Lacerta viridis* (RAYNAUD; ADRIAN, 1976); necrose visceral em *Agama Agama* (WATSON, 1993) e *Sauromalus varius* (WELLEHAN et al., 2003); lesões orais em lagartos do gênero *Gerrhosaurus* spp. (WELLEHAN et al., 2004) e *Varanus prasinus* (WELLEHAN et al., 2005); e sendo responsável por alterações como infiltrado linfoide histiocítico em fígado, baço, miocárdio e medula óssea em *Iguana iguana* (CLARK; KARZON; 1972) *.* Na Ordem Ophidia, está descrito em *Boa constrictor,* causando morte de filhotes em zoológico (HAUSER; METTLER; RUBEL., 1983), infecções em glândulas de veneno nas espécies *Naja naja* e *Bungarus fasciatus* (MONROE et al., 1968) e associado a doenças gastrointestinais (HELDSTAB; BESTETTI, 1984).

Nos quelônios de água doce, corpúsculos de inclusão intranucleares identificados na microscopia eletrônica foram encontrados em fígado, rim, baço, pâncreas e pulmão. Em quelônios terrestres, o primeiro relato ocorreu em 1982, na espécie *Gopherus agassizii,* em um abscesso faríngeo, quando esse vírus foi descrito como *tortoise herpesvirus* 1 (THV-1) (HARPER; HAMMOND; HEUSCHELE, 1982). Em 2005, um indivíduo da mesma espécie na Califórnia apresentava severa faringite e, na avaliação histopatológica, foi possível observar a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares sugestivos de infecção pelo herpesvirus, o que foi confirmado pela avaliação molecular. No entanto, tratava-se de um herpesvirus diferente do já descrito: *tortoise herpesvirus* 2 (THV-2) (JOHNSON et al., 2005b). Há também relatos na Europa de infecção por herpesvirus, tendo a estomatite como lesão macroscópica representativa, além de relatos em *Testudo graeca* (COOPER; GSCHMEISSNER; BONE,1988), com a presença de corpúsculos de inclusão e a detecção de herpesvirus em *swabs* oral e nasal em diversas espécies de tartarugas, em particular sendo o responsável por causar meningoencefalite em *Testudo hermanni* (HELDSTAB; BESTETTI, 1989).

Nas tartarugas-marinhas, a principal doença infecciosa descrita é a fibropapilomatose (FP) e sua etiologia tem sido relacionada a um herpesvirus, o *Chelonid alphaherpesvirus* 5 (ChHV5) (AGUIRRE et al., 1994). Além da

fibropapilomatose, a literatura descreve duas enfermidades nas tartarugas marinhas em que também há o envolvimento de herpesvirus, sendo elas: *Grey patch disease* e a *Lung, Eye, Trachea disease* (LET). A LET é uma epizootia caracterizada por pneumonia e material caseoso recobrindo os globos oculares e presente na cavidade oral, glote e traqueia. As tartarugas acometidas são frequentemente observadas com a boca aberta na superfície da água e apresentam ruídos respiratórios. Histopatologicamente, é caracterizada por áreas focais e difusas de necrose próximo à glote, se estendendo para a traqueia. Em algumas áreas, há presença de degeneração balonosa e necrose de células epiteliais da mucosa traqueal com corpúsculos de inclusão, sendo possível observar uma broncopneumonia intersticial com presença de inflamação (JACOBSON, 1986). Baseado em sequências nucleares das regiões UL26, DNA polimerase e glicoproteína B, foi possível identificar o agente, classificando-o na Subfamília Alphaherpesvirinae (McGEOCH; GATHERER, 2005). Jacobson (1986) nomeou o vírus como *lung, eye and tracheal virus* (LETV). Davison et al. (2009) classifica esse agente como *Chelonid herpesvirus 6,* de acordo com o ICTV*. A Grey Patch Disease* é caracterizada pela presença de lesões na pele, que se iniciam como pequenas, dispostas de forma circular, que se agregam formando manchas, caracterizadas histopatologicamente por células epiteliais. Estas apresentam corpúsculos de inclusão intranucleares (JACOBSON, 1981). De acordo com Davison et al., 2009, o agente etiológico é classificado como *Chelonid herpesvirus 1*. Todas as enfermidades descritas nas tartarugas-marinhas aqui são observadas acometendo em grande maioria uma espécie, a *Chelonia mydas*, sendo na *Grey Patch Disease* animais juvenis entre 56 e 90 dias após chegada em cativeiro (REBELL; RYWLIN; HAINES., 1975); na LET, tartarugas-verdes com mais de um ano (JACOBSON, 1986); e na FP *Chelonia mydas* juvenis, com menor frequência em subadultos e adultos, não havendo registros em filhotes e pós-filhotes (HERBST,1994).

2.4. Caracterização do ChHV5, aspectos etiológicos e prevalência da fibropapilomatose.

O primeiro registro da FP ocorreu em uma *Chelonia mydas* fêmea mantida no aquário de New York e proveniente de Key West na Flórida, EUA. Posteriormente, foi registrada a ocorrência da enfermidade em tartarugas-verdes de vida livre na

Flórida (LUCKE, 1938; SMITH; COATES, 1938). No Brasil, o primeiro caso no Espírito Santo foi registrado em 1986, e desde então, dados de 2000 a 2014 demonstraram altas prevalências nos estados do Ceará, seguido por Rio Grande do Norte, Espírito Santo e Sergipe (BAPTISTOTTE, 2016). As maiores prevalências da doença são encontradas em *Chelonia mydas* (AGUIRRE et al., 1999), mas há registro em *Caretta caretta* (HARSHBARGER, 1991), *Lepidochelys olivacea* (AGUIRRE et al., 1999), *Lepidochelys kempii* (BARRAGAN; SARTI, 1994), *Eretmochelys imbricata* (D'AMATO; MORAES-NETO, 2000) *e Dermochelys coriacea* (HUERTA et al., 2002).

Evidências baseadas em estudos moleculares sugerem que o *Chelonid alphaherpesvirus 5* 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). 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). Recentemente, em 2017, Work e colaboradores demonstraram *in vitro* a formação de corpúsculos de inclusão intranucleares, evidenciando a atividade lítica do agente em cultura organotípica de pele. O sequenciamento genômico, nesses casos em que o vírus não é facilmente cultivado (WORK et al., 2009) e isolado, é uma alternativa para estudos de ecologia, morfologia viral e patogênese da doença. No entanto, no ChHV5, o sequenciamento do genoma é prejudicado pela latência desse agente que mantém um número de cópias baixo em comparação ao DNA do hospedeiro (QUACKENBUSH et al., 2001) e prejudica a metodologia de purificação dos vírions (NG et al., 2009).

A partir de 1998, sequências curtas do DNA do *Chelonid alphaherpesvirus 5* foram descritas e depositadas no Genbank, possibilitando os primeiros estudos do genoma do ChHV5 (MONEZI, 2016). A organização parcial do genoma foi descrita pela primeira vez por Herbst e colaboradores em 2004, na qual a porção compreendida entre a região longa única UL9 até UL30 de 43.843pb foi descrita compreendendo 20 genes ortólogos aos genes cognatos de outros alphaherpesvirus e organizada de semelhante forma. De acordo com a análise filogenética baseada

na região UL27, o ChHV5 possui relação com o alphaherpesvirus, em particular com o herpes não oncogênico das tartarugas-marinhas descrito por Jacobson (1986) e denominado como LETV, classificado como *Chelonid alphaherpesvirus* 6, de acordo com Davison et al. (2009). Além dessa relação, um novo segmento de 4kb não equivalente a nenhum outro herpesvirus entre as regiões UL15 e UL18 foi descrito.

Em 2012, Ackermann e colaboradores sequenciaram o genoma completo através de mais de 10.000 clones de cromossomo artificial bacteriano (BAC), o que possibilitou a classificação do ChHV5 em tipo D, que é característico do gênero *Varicellovirus*. A sequência completa compreende um total de 132.233pb, organizados em uma sequência longa (UL), uma sequência curta (US) e sequências repetidas invertidas (IRs). A descrição de quatro genes atípicos que possuem similaridades com herpesvirus das outras subfamílias sugere que o ChHV5 pode combinar características das três subfamílias. Estes genes podem estar relacionados à replicação viral e à ação anti-apoptose, desempenhando funções na patogênese da formação de tumores ou na fuga do sistema imunológico.

Embora o uso de clones BAC não seja eficiente para o sequenciamento de grandes porções do genoma, este trabalho possibilitou novos caminhos para explorar a epizootiologia molecular da FP. Um recente estudo baseado nas sequências disponíveis do ChHV5 e utilizando a PCR de longo alcance sequenciou genomas virais parciais de tecido tumoral de *Chelonia mydas* acometidas pela FP proveniente da Flórida e do Havaí, aumentando o número de sequências de ChHV5 disponíveis. Como descrito na literatura científica, ao comparar Havaí e Flórida, há uma diferença na manifestação clínica da doença. No Havaí, ocorre a prevalência de tumores orais, o que não é encontrado na Flórida, como também foi observado um declínio de casos no Havaí, ao contrário do ocorrido 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).

Estudos anteriores a esse demonstraram que há diferenças entre as cepas virais de acordo com a localização geográfica, no entanto, em termos de sequência, essas diferenças eram pequenas, baseadas em análises *single-loci*. Nesse estudo, ao realizar análises *multi-loci,* foi possível observar que essas diferenças são maiores do que as já descritas, sustentando a hipótese de que isso pode influenciar na patogênese da FP. Também foi sugerido a possibilidade futura de coinfecção

interespécies possivelmente latente por variantes geográficas bem diferenciadas devido à história natural das tartarugas-marinhas e seu comportamento em áreas de alimentação, assim como a evidência da evolução dos vírus por recombinação, demonstrada entre as cepas do Havaí e da Flórida, o que pode influenciar na virulência (MORRISON et al., 2018). No Brasil, em 2015, Gattamorta investigou a possível relação das variações de sequências de DNA polimerase de ChHV5 e os determinados haplótipos de tartarugas verdes em regiões da costa brasileira. Nesse estudo, detectou-se 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.

Os fibropapilomas cutâneos caracterizam-se por massas tumorais simples ou múltiplas que variam em tamanho (0,1 a 30cm de diâmetro) e aspecto (verrucoso ou liso), podem ser sésseis ou pedunculados e distribuem-se geralmente em nadadeiras, pescoço, cabeça, regiões inguinal e axilar e base da cauda (HERBST, 1994). O tamanho e a quantidade de tumores podem interferir na habilidade do animal em se locomover e se alimentar, além de gerar quadros crônicos de estresse e imunodepressão (AGUIRRE, 1998; WORK; BALAZS, 1999). Grandes massas ulceradas e necróticas possibilitam a entrada de outros patógenos, o que pode ampliar os quadros de mortalidade (HERBST, 1994).

Histologicamente, os tumores caracterizam-se por apresentar hiperplasia epidermal papilar suportada em uma matriz fibrovascular com uma proporção de proliferação dermal ou epidermal variável, classificando-os em papiloma, fibroma ou fibropapiloma. Os papilomas apresentam proliferação do componente epidermal, enquanto os fibromas apresentam proliferação do componente dermal e os fibropapilomas apresentam proliferação tanto do componente epidermal quanto do dermal (HERBST, 1994). Demais características histológicas, como hiperqueratose, nucléolos proeminentes, discariose, halo nuclear e corpúsculos de inclusão intranucleares, podem estar presentes (MATUSHIMA et al., 2001). Além dos tumores externos, nódulos viscerais também podem ser encontrados (NORTON; JACOBSON; SUNDBERG, 1990). Estes são descritos como fibromas, mixofibromas ou fibrossarcomas de baixo grau de malignidade, localizados principalmente em pulmões, coração, rins e intestinos, podendo gerar disfunção orgânica e morte (WORK, 2016). Jacobson et al. (1989), supõe que esses tumores internos estão presentes na fase tardia da doença e são considerados lesões crônicas.

Em tartarugas-verdes de Porto Rico, Kang et al. (2008) determinou a localização e distribuição do ChHV5 em fibropapilomas e fibromas por meio da técnica de hibridização *in situ* (ISH) e detectou a presença de DNA viral e sinais virais em núcleos de células epiteliais, o que pode ser atribuído ao tropismo de alphaherpesvirus por essas células. Baseado na sequência de nucleotídeos, Ene et al. (2005) e Herbst et al. (2004) determinaram quatro variantes virais na Flórida, denominadas A, B, C e D, sendo que diferentes espécies de tartarugas marinhas de mesma área geográfica compartilharam a mesma variante, o que indica que a FP é geograficamente e/ou regionalmente específica. No Brasil, Rodenbusch et al. (2014) identificou as variantes 1, 2 e 4 presentes em Ubatuba/SP (depositadas no Genbank como JN938584, JN938585 e JN938587, respectivamente) e Gattamorta (2015) detectou uma nova variante, ampliando assim a diversidade de variantes encontradas na costa brasileira. Essa nova variante de CFPHV descrita, detectada em secreções, cérebro, pele e tumor, apresenta 100% de identidade com as sequências obtidas por Patricio et al. (2012) (depositadas no Genbank como JN580279, JN580280, JN580281, JN580282, respectivamente), referentes a sequências detectadas em Porto Rico e Golfo da Guiné, o que sugere que estes vírus podem circular entre diferentes regiões e serem transmitidos por secreções, além da entrada de novas variantes na costa brasileira. 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).

Quackenbush et al. (2001), detectaram a presença do agente em órgãos internos, como fígado, cérebro, gônadas, coração e pulmões, mas não caracterizaram as alterações histológicas que poderiam ser decorrentes da infecção pelo ChHV5. Lesões causadas por herpesvirus já foram estudadas em *Vipera ammodytes ammodytes*, 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). Em tartarugas-marinhas, achados necroscópicos associados ao herpesvirus incluem hepatomegalia e edema pulmonar, e já foram observados corpúsculos de inclusão em pulmões, rins e pâncreas na avaliação histopatológica (MARSCHANG, 2011).

A FP tem ocorrência circuntropical, tendo sido encontrada em todos os grandes oceanos e registrada em indivíduos juvenis, subadultos e adultos (HERBST, 1994). De acordo com a literatura descrita aqui anteriormente, há evidências de que a FP possui associação com o ChHV5. No entanto, há um consenso de seu caráter multifatorial, que pode estar associado a fatores ambientais e genéticos, e não somente a um fator primário (BALAZS, 1991; JACOBSON et al., 1991; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997; AGUIRRE et al., 1998). Recentes estudos apontam a detecção de ChHV5 em espécies de tartarugas-marinhas saudáveis, indicando que a infecção por ChHV5 pode se manter latente nesses indivíduos (PAGE-KARJIAN et al., 2012; ALFARO–NUNEZ et al., 2014; PAGE-KARJIAN et al., 2015; GATTAMORTA, 2015; ALFARO- NUNEZ et al., 2016). Estudos também indicam a suspeita da participação de sanguessugas do gênero *Ozobranchus* e de peixes limpadores da espécie *Thalassoma duperrey* como vetores mecânicos do ChHV5 (LU et al., 2000; GREENBLATT et al., 2004).

Em 2016, foram apresentados dados da ocorrência da FP na costa brasileira referente ao período de 2000 a 2014, nos quais estão inclusos os dados do estudo de Baptistotte (2007) referente ao período de 2000 a 2005. A média da prevalência da FP foi de 32,59% (n=2940) no Ceará, 21,18% (n=779) na área costeira do Rio Grande do Norte, 0,14% (n=720) no Atol das Rocas (RN), 26,06% (n=278) na Paraíba, 0,41% (n=245) em Pernambuco, 13,91% (n=1330) em Alagoas, 13,92% (n=819) em Sergipe, 22,66% (n=7176) na Bahia, 21,06% (n=5124) no Espirito Santo, 20,20% (n=5.390) no Rio de Janeiro, 10,43% (n=11366) em São Paulo, 4,21% (n=831) em Santa Catarina e 0,04% (n=2.431) no Rio Grande do Sul. Os dados referentes ao estado da Paraíba foram do período de 2002 a 2006. De acordo com esses dados, foi possível observar um decréscimo da doença durante o período e tartarugas verdes juvenis (CCC entre 40 e 60 cm), sendo predominantemente acometidas. A ocorrência somente foi registrada em áreas costeiras, não sendo observada no Atol das Rocas/RN e em Fernando de Noronha/PE até 2014 (BAPTISTOTTE, 2016). Em 2015, foi detectada a presença ChHV5 em secreção oral proveniente de Fernando de Noronha/PE de um animal que não possuía tumores e apresentou resultado negativo para amostra de pele (GATTAMORTA, 2015).

2.5 Persistência do ChHV5 em potenciais locais não cutâneos.

No Havaí, a manifestação da doença como descrita na literatura é predominantemente caracterizada pela presença de tumores orais, diferentemente do que ocorre na Flórida, onde a presença destes já foi descrita (BRESETTE et al., 2003). No entanto, há prevalência de tumores externos. Os tumores são classificados como orais quando estão localizados na cavidade, glote, palato mole e/ou duro, faringe e língua. Além destes tumores, nódulos viscerais em pulmões, rins e coração também podem ser encontrados (NORTON; JACOBSON; SUNDBERG, 1990; AGUIRRE et al., 2001) e, como já descrito anteriormente, estes são denominados tumores internos. Com base na histologia, são classificados como mixofibromas, fibromas ou fibrossarcomas de baixo grau de malignidade.

Em 1994, Herbst descreveu a presença de tumores internos em *Chelonia mydas* no Havaí. Neste estudo, os órgãos mais acometidos foram pulmões, seguidos de rins, coração, trato gastrointestinal e fígado, sendo observada a presença de tumores internos em mais de um órgão em um mesmo espécime. Aguirre et al. (1998) também descreveu a presença de tumores internos nos pulmões, rins, coração, baço e estômago em tartarugas verdes na Florida e em Porto Rico. Williams et al. (1994) descreveu os pulmões e os rins como sendo os órgãos mais acometidos nessa espécie. Work et al. (2004), em um estudo retrospectivo de casos de *Chelonia mydas* acometidas pela FP no Havaí durante o período de 1993 a 2003, encontrou a presença de tumores internos em 39% (99/255) dos casos, predominantemente encontrados em pulmões, seguidos de rins e coração

Em tartarugas verdes acometidas pela FP, o ChHV5 já foi detectado em pele (LU et al., 2000; QUACKENBUSH et al., 2001; PAGE-KARJIAN et al., 2012), pulmões, rins, coração, baço, fígado, cérebro, tecido periorbital, nervos, ovários, testículos, língua, vesícula biliar e tireoides, mesmo com a ausência de lesão nesses tecidos (LU et al., 2000), além da 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). De acordo com o estudo de Lu et al. (2000), análises comparativas demonstraram que pele, tecido periorbital, pulmões, coração, vesícula biliar e nervos são locais em que 90% dos casos foram positivos para ChHV5, ao contrário dos resultados encontrados no

fígado, onde menos de 50% (9/17) foram amostras positivas. Page Karjian et al. (2017) demonstrou em seu estudo que os rins foram o local com maior prevalência de ChHV5, seguido dos tumores.

Como já descrito no tópico anterior dessa revisão, estudos recentes detectaram a presença de ChHV5 em animais que não apresentavam lesão indicando o caráter latente da infecção. A detecção do ChHV5 em tartarugas não acometidas pela FP é descrita em pele (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). Estudos investigaram a presença de ChHV5 em demais órgãos desses animais, dentre eles: pulmões, baço, fígado, musculo esquelético, vesícula biliar, jejuno e adrenais (LU et al., 2000; PAGE-KARJIAN et al., 2017), mas não encontraram resultado positivo.

Evidências apontam que os tumores cutâneos são uma fonte de herpesvirus. No entanto, mesmo com a detecção do ChHV5 na grande maioria, há muitos casos em que a replicação não está ocorrendo nesses locais. Em 2014, Work e colaboradores sugeriram que alguns tumores apresentam focos de infecção produtiva em queratinócitos epidérmicos com infecção latente em fibroblastos dérmicos, bem como em outros sítios anatômicos (HERBST et al., 1998; GREENBLATT et al., 2004), o que pode ser relacionado com a detecção do ChHV5 nos tecidos descritos pelos demais estudos citados (PAGE-KARJIAN et al., 2017). Em outras infecções ocasionadas por herpesvirus, infecções subclínicas e latentes foram determinadas nos rins, nervos cranianos e tecidos linfoides (CHEN; HUDNALL, 2006; GILDEN et al., 2011). Sendo assim, diante do pouco elucidado sobre a patogênese da FP, se o ChHV5 tiver comportamento semelhante aos demais herpesvirus, esses podem ser possíveis locais de persistência viral (PAGE-KARGIAN et al., 2017).

No Brasil, há registros de tumores internos, caracterizados como fibromas, nos pulmões, coração e rins de *Chelonia mydas,* as quais apresentavam tumores externos e vieram a óbito no Aquário de Santos, Litoral Sul de São Paulo. No entanto, nesse estudo não foi realizada a detecção molecular do ChHV5 nesses tumores, e as características histológicas diferiram das descritas na literatura de tumores internos encontrados no Havaí (DUTRA; NASCIMENTO; FUTEMA, 2012). CRUZ-OCHOA (2017) também relatou a presença de fibroma em pulmões de

Chelonia mydas proveniente de Ubatuba/SP. Em necropsias realizadas em tartarugas verdes acometidas pela FP provenientes do Espírito Santo, São Paulo e Bahia, foi registrado a presença de tumores internos na cavidade oral e esôfago (ROSSI et al., 2016). Em Pernambuco, nódulos viscerais caracterizados como fibromas foram descritos nos pulmões, pele e estômago, na porção mais próxima ao esôfago, em *Chelonia mydas* (BRITO et al., 2004). Baseado nos trabalhos encontrados nessa revisão, os dados indicam que, no Brasil, tumores internos não prevalecem como forma de manifestação da FP. No entanto, registros podem não ter sido realizados em muitos casos devido à condição das carcaças e/ou não analisados durante a necropsia. Recentes estudos a partir do desenvolvimento das técnicas moleculares, em grande maioria com animais do Havaí e da Flórida, locais em que diferem na manifestação da doença, associam essa diferença a variantes virais. De acordo com o aqui revisado, variantes virais desses locais não foram descritas no Brasil, o que pode justificar essa diferença da manifestação. Em *Chelonia mydas* acometidas pela FP no Brasil, Rodenbusch et al. (2014) detectou o ChHV5 em tumores, Gattamorta (2015) detectou em pele, tumores, secreções e cérebro, Monezi et al. (2016) detectou em tumores e secreções. Em tartarugas não acometidas pela FP, de acordo com esta revisão, há registro da detecção em pele, secreções e cérebro (GATTAMORTA, 2015).

3 OBJETIVO GERAL

Detecção de *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5) em tecidos tumorais, pele e pulmões de indivíduos de *Chelonia mydas* (tartaruga-verde), acometidos e não acometidos pela fibropapilomatose, provenientes do Litoral Norte do Estado de São Paulo.

3.1 Objetivos específicos

● Detectar a prevalência de ChHV5 em indivíduos de *Chelonia mydas,* acometidos e não acometidos pela fibropapilomatose, através da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR).

● Correlacionar a presença/ ausência do ChHV5 nos tecidos estudados em um mesmo indivíduo.

● Determinar a localização do ChHV5 em tumores estudados, através da técnica de hibridização *in situ*.

● Comparar as técnicas de hibridização *in situ* e reação em cadeia pela polimerase (PCR).

● Relacionar a presença/ausência do ChHV5 determinada pela avaliação molecular com os achados histopatológicos presentes nos tecidos estudados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo, manejo e seleção das tartarugas

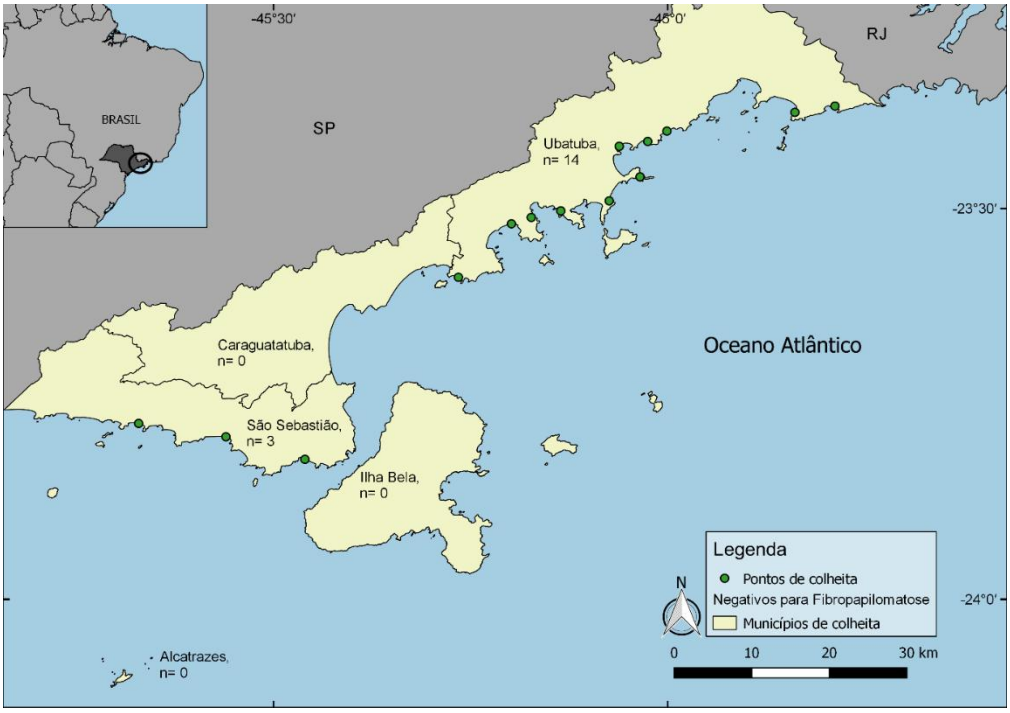
Neste estudo, foram avaliadas amostras biológicas (tumores externos/internos; pele e pulmões) provenientes de 53 indivíduos de *Chelonia mydas* (tartaruga-verde), sendo 35 acometidos pela fibropapilomatose e 18 não acometidos pela doença. Autorização SISBIO Nº 32636-7; 32636-9 e CEUA Nº 9465110716.

Desde o ano de 2000, foi inserida na base de dados do Projeto TAMAR a categoria "tumores". Cada indivíduo capturado incidentalmente, encontrado encalhado ou boiando, 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 e largura curvilínea da carapaça- LCC), número da marcação, condição geral (morta/viva) e condição corporal, entre outros (BAPTISTOTTE., 2016). De acordo com estes dados, 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. As Figuras 4 e 5 apontam os pontos de colheita destes indivíduos, acometidos e não acometidos pela FP, respectivamente, determinando a localidade. Em três indivíduos, sendo dois acometidos pela FP e um não acometido, não foram registrados os dados referentes à localidade destes animais. Assim, o número amostral (n) presente nas Figuras 4 e 5 corresponde aos indivíduos que possuíam o registro de localidade.

Figura 4. Demarcação das regiões (localidade) onde os indivíduos de *Chelonia mydas* (tartaruga-verde) acometidos pela FP estudados foram encontrados.

Fonte: Elaborado por Eduardo Machado para este estudo.

Figura 5. Demarcação das regiões (localidade) onde os indivíduos de *Chelonia mydas* (tartaruga-verde) não acometidos pela FP estudados foram encontrados.



Fonte: Elaborado por Eduardo Machado para este estudo.

As amostras biológicas avaliadas foram coletadas, no período de 2016/2017, em sua maioria, no Projeto TAMAR, base de Ubatuba/SP, onde se encontra uma estrutura de reabilitação e monitoramento da área. Devido a isso, há permanência de tartarugas-marinhas, principalmente tartarugas-verdes, e um elevado número de animais capturados na região. Uma menor parte das amostras foram procedentes de auto de infração ambiental no Arquipélago de Alcatrazes, São Sebastião/SP, e encaminhadas para o Grupo de Pesquisa sobre Fibropapilomatose em Tartarugas Marinhas, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP).

No Brasil, duas bases do Projeto TAMAR estão em áreas exclusivamente de alimentação, sendo a base de Ubatuba/SP uma destas e a única presente no Sudeste Brasileiro, monitorando assim as tartarugas-marinhas presentes em toda a microrregião do Litoral Norte do Estado de São Paulo. De acordo com os dados apresentados no relatório NOOA por Baptistotte (2016), baseado no banco de dados do Projeto TAMAR, a média de prevalência de *C.mydas* acometidas pela FP no estado de São Paulo no período de 2000 a 2014 foi de 10,4% (n=11366). A literatura sugere que a infecção pelo ChHV5 ocorre nas áreas de alimentação (ENE et al., 2005; CHALOUPKA et al., 2008), ressaltando a importância de estudos em indivíduos provenientes destas regiões.

4.2 Obtenção dos dados biométricos

Foram coletados os dados biométricos: comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), largura curvilínea da carapaça (LCC) e massa corpórea (MC) de cada espécime.

4.3 Obtenção das amostras de pele, pulmões e tumores.

Foram amostrados 53 indivíduos, sendo que, em cada indivíduo, ao menos uma das amostras de tecidos (tumor externo e/ou interno, pele e pulmões) foi coletada. A coleta dos tecidos amostrados variou de acordo com as seguintes situações: 1- Se o indivíduo possui ou não a presença de tumores externos (acometido ou não acometido pela FP); 2- Se o indivíduo veio a óbito durante o período das coletas; 3- Se o indivíduo foi encaminhado morto. Baseado nestas

situações, as amostras foram obtidas das seguintes maneiras: na situação 1, foram realizadas biópsias de pele nos indivíduos que não possuíam tumores externos (não acometidos pela FP) e biópsias de pele e tumor nos que possuíam tumores externos (acometidos pela FP). Durante o período decorrido da coleta, alguns indivíduos que passaram por biópsias vieram a óbito; nesta situação, definida como 2, foram obtidas amostras de pulmões destes espécimes em necropsia e foi avaliada a presença de tumores internos. Logo, estes animais possuem pele e/ou tumor externo procedentes de biópsia e pulmões e/ou tumor interno procedentes de necropsias. Na situação 3, todos os tecidos amostrados (pele, tumor externo e/ou interno e pulmões) foram obtidos em necropsia. As situações 1 e 2 compreendem os indivíduos coletados no Centro de Reabilitação do Projeto TAMAR em Ubatuba/SP (50/53 espécimes), enquanto que a situação 3 corresponde aos três espécimes (3/53 espécimes) provenientes do auto de infração no Arquipélago de Alcatrazes/SP.

4.3.1 Acometidos pela FP

Dos 35 espécimes amostrados acometidos pela FP, três correspondem aos animais recebidos mortos provenientes do Arquipélago de Alcatrazes/SP; e dos 32 animais coletados no Centro de Reabilitação do Projeto TAMAR Ubatuba/SP, 10 vieram a óbito. Cabe ressaltar que mais de uma amostra de tumores externos foram coletadas em alguns indivíduos, e que foi encontrada em exame necroscópico a presença de tumor interno em pulmões de um indivíduo. Em três indivíduos, não foram realizadas a biópsia de pele, e um indivíduo tinha sido submetido a cirurgia de retirada de tumores antes da coleta (assim, esta amostra não foi obtida). A Tabela 1 apresenta a síntese das amostras obtidas destes espécimes, sendo que a discriminação destas foi realizada de acordo com a situação (descrita anteriormente) em que o indivíduo se encontrava no momento da coleta.

Tabela 1- Discriminação das amostras obtidas de indivíduos de *Chelonia mydas* acometidos pela FP, baseada na situação dos indivíduos no momento da coleta. (continua)

Indivíduos acometidos pela FP	n de amostras/ n de indivíduos correspondentes			
	Tumor externo	Tumor interno	Pele	Pulmões
Vivos (situação 1)	31/31	[1]SA	29/29	[1]SA

(continuação)

Indivíduos acometidos pela FP	n de amostras/ n de indivíduos correspondentes			
	Tumor externo	Tumor interno	Pele	Pulmões
Vieram a óbito (situação 2)	[2]BI	1/1	[2]BI	10/10
Encaminhados mortos (situação 3)	11/3	[3]NE	3/3	3/3
Não coletados	1/1	0	3/3	0

Fonte: Elaborado pelo autor.
[1]SA sem amostragem; [2]BI biópsia; [3]NE não encontrado;

4.3.2 Não acometidos pela FP

Dos 18 espécimes não acometidos pela FP, todas as amostras foram coletadas no Centro de Reabilitação do Projeto TAMAR em Ubatuba/SP. Logo, a determinação dos tecidos amostrados variou de acordo com as situações 1 e 2 (descritas anteriormente), que indicam se os indivíduos possuem ou não tumores externos e se vieram a óbito durante o período decorrido das coletas, respectivamente. Destes 18 espécimes, 15 vieram a óbito. Foram obtidas 18 amostras de pele procedentes de biópsia e 14 amostras de pulmões procedentes de necropsia. Em um indivíduo que veio a óbito, não foi obtida amostra de pulmões. A Tabela 2 apresenta a síntese das amostras obtidas destes espécimes, sendo que a discriminação destas foi realizada de acordo com a situação (descrita anteriormente) em que o indivíduo se encontrava no momento da coleta.

Tabela 2- Discriminação das amostras obtidas de indivíduos de *Chelonia mydas* não acometidos pela FP, baseada na situação dos indivíduos no momento da coleta.

Indivíduos não acometidos pela FP	n de amostras/ n de indivíduos correspondentes	
	Pele	Pulmões
Vivos (situação 1)	18/18	[1]SA
Vieram a óbito	[2]BI	14/14
Não coletados	0	1/1

Fonte: Elaborado pelo autor.
[1]SA sem amostragem; [2]BI biópsia.

4.3.3 Visão geral das amostras obtidas com base na situação dos espécimes.

De maneira geral, as amostras obtidas neste estudo foram provenientes de 25 espécimes que permaneceram vivos até o final do período de coletas, 25 que vieram a óbito e três que foram encaminhados mortos. A tabela 3 apresenta de forma geral as amostras obtidas neste estudo que foram submetidas às análises.

Tabela 3. Amostras obtidas dos indivíduos de *Chelonia mydas,* acometidos e não acometidos pela FP, baseada na situação dos indivíduos no momento da coleta.

Indivíduos	FP +/-		n de amostras/ n de indivíduos correspondentes							
			Tumor ext		Tumor int		Pele		Pulmões	
	FP+	FP-	FP+	FP-	FP+	FP-	FP+	FP-	FP+	FP-
Vivos	32	18	31/31	[1]SA	[1]SA	[1]SA	29/29	18/18	[1]SA	[1]SA
Vieram a óbito	10/32	15/18	BI	[1]SA	1/1	[3]NE	[2]BI	[2]BI	10/10	14/14
Enc.Mortos	3	0	11/3	0	[3]NE	[3]NE	3/3	0	3/3	0
Total	53		42		1		50		27	

Fonte: Elaborado pelo autor.
[1]SA sem amostragem; [2]BI biópsia; [3]NE não encontrado.

As coletas das amostras por biópsia foram realizadas com material cirúrgico estéril (bisturi), individualizado para cada animal e cada fragmento de tecido coletado. A região a ser coletada foi previamente higienizada com solução iodopolvidine e os fragmentos de pele e tumores foram divididos em duas partes iguais. As amostras de pulmões e do tumor interno (quando presentes) foram coletadas por Cruz-Ochoa (2017).

Cada amostra foi armazenada em microtubos, contendo solução formalina tamponada para caracterização histopatológica e solução RNAlater para avaliação molecular (PCR e hibridização *in situ*). O transporte foi feito sob refrigeração até os laboratórios da USP para o processamento das amostras.

4.4 AVALIAÇÃO MOLECULAR

4.4.1 Preparação das amostras para extração de DNA

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

4.4.2 Extração de DNA

Em uma alíquota de 100µL do sobrenadante de cada amostra, foram adicionados 500µL de solução de lise (SDS 1%; 100mM EDTA pH 8.0; 20mM Tris-HCl ph 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 500 µL do sobrenadante foi transferida para outro microtubo e 500µL de isopropanol foram adicionados. Esta solução foi incubada a -20 ºC overnight e, em seguida, centrifugou-se 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 30 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 PCR.

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

4.4.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A metodologia descrita neste tópico foi feita de acordo com o estudo de Gattamorta (2015). Amostras de pele, tumores externo e interno (quando presentes) e pulmões (quando coletados) foram submetidas à detecção do ChHV5 através da técnica por reação em cadeia pela polimerase (PCR), apresentando resultados de maneira qualitativa. Os *primers* utilizados e os tamanhos dos fragmentos amplificados foram apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. *Primers* e Genes-alvos utilizados para a detecção do ChHV5 neste estudo.

Primers e 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).
F-US3B Similar a uma serina/treonina quinase	F: TAGAGGTTCGGCTTTGGCTG R: CGCCATTCAGTTGCTCGAAG	~700pb	Gattamorta (2015).
GTHV DNA polimerase de ChHV5	F: GACACGCAGGCCAAAAAGCGA R: AGCATCATCCAGGCCCACAA	~480pb	Quackenbush et al. (2001).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A amplificação de cada uma das sequências-alvo foi realizada conforme o seguinte protocolo: os genes UL18, de acordo com Alfaro-Nunez; Gilbert (2014), o gene da DNA polimerase, conforme Rodenbusch et al., (2014), e o gene F-US3B, conforme Gattamorta (2015).

4.4.4 Leitura e análise dos produtos da PCR

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal (25µL DNA amplificado) acrescidos de 2 µL de corante Gel Loading Buffer (Invitrogen Carlsbad, CA) em gel de agarose 2,0%, acrescidos de tampão de corrida TBE 0,5X pH 8,0 a 110V/50mA. O gel foi corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Carlsbad, CA) e visualizado com luz ultravioleta (UV) em câmara escura. As amostras que revelaram bandas de DNA do tamanho do fragmento de cada gene e, de acordo com o controle positivo, foram consideradas positivas para a reação de PCR utilizada.

4.4.5 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.

4.4.6 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 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.

4.4.7 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*.

4.4.8 Preparação da *probe* para hibridização *in situ*

Riboprobes foram gerados com base nos *amplicons* da DNA polimerase FPTHV (UL30, pol) obtidos pela PCR (Genbank número de acesso AF035003). Os *amplicons* de 364 pb foram produzidos por *primers* de PCR primários (F: 5' AGCATCATCCAGGCCCACAATCTG-3'; R: 5'-CGGCCAGTTCCGGCGCGTCGACCA- 3'), e *nested* PCR *primers* com os adaptadores SP6 e T7 (*forward* 5 '-ggtacctaatacgactcactatagggaCGGCGAGCCGAAACGCTCAAGG-3' e *inverter*: 5'-ggtaccatttaggtgacactatagaatagtTCCGTTCCCCAGCGGGTGTGAA-3'), seguido por purificação a partir de um gel de agarose. Os produtos de PCR amplificados foram sequenciados e uma busca por homologias com sequências conhecidas foi feita usando o banco de dados de nucleotídeos *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. As *probes sense* (detecta DNA genômico viral) e *anti-sense* (detecta mRNA de cadeia positiva de FPTHV) foram geradas por transcrição in vitro do produto de PCR utilizando o kit de marcação DIG RNA (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), seguindo as instruções do fabricante e armazenado a -80 ° C.

4.4.9 Hibridização *in situ*

Fragmentos de 3 µm de tumores externos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE) foram desparafinados e reidratados manualmente. O bloqueio endógeno da peroxidase foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio a 6% (Quimesp Química, Guarulhos, Brasil) e metanol (Merk, Darmstadt, Alemanha) (volume/volume) por 10 min. Resumidamente, para a digestão enzimática, o tecido foi tratado com solução de pepsina a 37ºC durante 30 minutos e depois lavado com água destilada à temperatura ambiente. Após a etapa de pré-

tratamento térmico (incubação em EDTA por 15min; 98ºC; lavagem de água destilada por 1 min, temperatura ambiente), esfregaços foram hibridizados com uma mistura de *probes sense* e *anti-sense* marcadas (5µl, 10 min a 75ºC e overnight a 37ºC em câmara úmida). Para a detecção e CISH, foi utilizado o Kit Zytofast Plus Cish Implementation Kit-HRP-DAB (Zytovision, Bremerhaven, Germany - Ref. T-1063-40), de acordo com as instruções do fabricante (Zytovision, Bremerhaven, T-1063-40). A detecção do DNA de FPTHV em esfregaços foi realizada por *rabbit-anti-DIG* (60 min at 37ºC) e *anti-rabbit-HRP-polymer* (60 min, 37ºC). Para a contrastação, utilizou-se hematoxilina de Mayer (1 min, temperatura ambiente). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina e cobertas com Permount (Fisher Scientific, St. Louis, MO, EUA). Os esfregaços corados foram avaliados por microscopia de luz (Olympus CX22 Led) sob objetivas 40x e 100X. Esfregaços com células marcadas em marrom (DAB) sobre o fundo azul foram considerados positivos. Uma probe *non-sense* de DNA (Zytovision, Bremerhaven, Alemanha) e solução de hibridização sem a *probe* foram utilizadas como controles negativos.

4.5 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As amostras de tumor externo e pele coletadas por biópsia foram fixadas em formol 10% e seccionadas em fragmentos menores, os quais foram tratados em soluções crescentes de álcool (70°, 95º e absoluto), sendo desidratados. A seguir, esse material foi diafanizado por imersão em xilol e incluso em parafina. Após solidificação da parafina, os blocos foram aparados e preparados para serem adaptados ao micrótomo, no qual foram obtidos cortes de aproximadamente 5 µm de espessura. Após obter os cortes, a técnica de coloração realizada foi Hematoxilina-Eosina. A maioria das avaliações histopatológicas de pulmões foram realizadas pelo estudo de Cruz-Ochoa (2017). Os pulmões coletados durante a necropsia neste estudo foram submetidos à mesma metodologia de processamento já citada para tumores externos e pele.

A observação das lâminas foi feita em microscópio de luz comum, em aumentos crescentes, pesquisando corpúsculos de inclusão viral de acordo com a proposta deste trabalho e buscando confrontar os nossos achados com as avaliações moleculares (PCR e hibridização *in situ*), bem como com as descrições disponíveis em outros trabalhos científicos

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Espécimes

Neste estudo, a prevalência de indivíduos acometidos pela fibropapilomatose foi de 66,03% (35/53) (Tabela 4).

Tabela 4. Prevalência de FP, Origem e Localidade dos indivíduos de *Chelonia mydas* acometidos e não acometidos pela FP.

[1] +/- FP	Indivíduos	Indivíduos Amostrados		Localidade				Origem		
		[2]LOC	[3]ORI	[4]UBA	[5]SSB	[6]ILB	[7]CGT	[8]P	[9]E	[10]B
+ FP	35/53	33/35	31/35	26	5	1	1	24	4	3
- FP	18/53	17/18	16/18	14	3	0	0	3	4	9
Total	53	50	47	50				47		

Fonte: (Elaborado pelo autor).
[1] FP+/FP- acometidos pela FP e não acometidos pela FP; [2] Localidade; [3] Origem; [4] Ubatuba/SP; [5] São Sebastião/ SP; [6] Ilha Bela/SP; [7] Caraguatatuba/SP; [8] Pesca; [9] Encalhe; [10] Boiando.

Os espécimes acometidos pela FP foram, em sua maioria, provenientes de Ubatuba/SP – seguido por São Sebastião/SP, Ilha Bela/SP e Caraguatatuba/SP, sendo que dentro de São Sebastião/SP há registros no Arquipélago de Alcatrazes/SP. Os espécimes não acometidos são provenientes de Ubatuba/SP, seguido por São Sebastião/SP (Tabela 4). Estes dados indicam a presença de FP nestas localidades, que compõem a microrregião do litoral Norte do Estado de São Paulo.

Esta microrregião é uma área de alimentação de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas)* e, com base na história natural desta espécie e em seu comportamento nestas áreas, sabe-se que as *Chelonia mydas* migram entre as áreas de alimentação. Ottoni- Neto; Gallo; Becker (2012) registrou casos de recaptura, no Arquipélago de Alcatrazes/SP, de indivíduos provenientes da Laje de Santos/SP e de Ubatuba/SP, bem como o caso de um indivíduo procedente do Arquipélago de Alcatrazes/SP recapturado em Almofala/CE.

A microrregião do Litoral Norte do Estado de São Paulo possui forte pressão oriunda da ocupação humana, com a concentração da população em faixas litorâneas. Economicamente, é caracterizada pela presença de empreendimentos em ampliação, instalação e operação (Porto de São Sebastião – Cais Comercial Público e Terminal Marítimo Almirante Barroso; Unidades da Petrobras em São Sebastião e Caraguatatuba; Estrada do Contorno Norte; e Exploração e Produção de Petróleo e Gás Natural no Polo Pré-Sal da Bacia de Santos), além da pesca e aquicultura, atividades imobiliárias e turismo, sendo esta última sua principal vocação (ICMBIO, 2017).

O setor industrial está em crescimento em consequência da expansão das atividades portuárias e petroleiras, principalmente em São Sebastião/SP e Caraguatatuba/SP, considerando o Pré-Sal e suas atividades como o principal fator atual para ampliação da malha viária. O Terminal Marítimo Almirante Barroso é o maior terminal aquaviário da América do Sul em volume de carga, chegando a 50% de toda a produção do Brasil, o que equivale à movimentação de 4 bilhões de litros por mês de petróleo. Por isso, é considerado como a terceira melhor região portuária do mundo. Em Caraguatatuba/SP, a Unidade de Tratamento de Gás Monteiro Lobato possui produção de 17,41 milhões de metros cúbicos de gás por dia e, até 2016, processou todo o gás produzido pela Bacia de Santos, o que equivale a 70% da produção da camada Pré-sal. Além destas atividades, estas regiões são povoadas por populações tradicionais (indígenas, quilombolas, caiçaras), que executam atividades de agricultura, pecuária e pesca artesanal (ICMBIO, 2017).

Baseado na literatura, há um consenso de que a etiologia da FP é multifatorial (JACOBSON et al., 1991; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997; AGUIRRE et al., 1998) e que fatores como o desenvolvimento demográfico e atividades industriais e agronômicas próximas a ambientes costeiros podem contribuir para o aumento da prevalência desta (ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997). Também é sugerido que poluentes químicos induzam à quebra da latência viral ou causem imunossupressão, contribuindo para o desenvolvimento da FP (HERBST; KLEIN, 1995).

Estudos que abrangem a região de Ubatuba/SP demonstram que os indivíduos presentes nesta região foram expostos a compostos organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPS), poluentes orgânicos persistentes (POPs) e metais. Sanchez-Sarmiento et al. (2016) demonstraram a presença de compostos organoclorados em *Chelonia mydas*, assim como Vilca et al. (2018)

demonstrou a presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), integrantes naturais do petróleo, em *Chelonia mydas*, apontando diferença nos níveis em animais acometidos e não acometidos pela FP. Além disso, poluentes orgânicos persistentes (POPs) foram detectados em pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) (BALDASSIN et al., 2012). Em outras regiões do Brasil, metais como prata (Ag), cádmio (Cd), cobre (Cu), zinco (Zn) e chumbo (Pb) foram detectados (SILVA et al., 2014), e concentrações de mercúrio foram encontradas em *Chelonia mydas* (BEZERRA et al., 2013).

Dados de prevalência da doença no Brasil, referentes à análise de banco de dados de 2000 a 2014, demonstraram que, durante este período, a prevalência da doença no Arquipélago de Fernando de Noronha/PE e no Atol das Rocas/RN foi zero (BAPTISTOTTE, 2016). Isso sugere que a doença não ocorre nestes ambientes, baseado na possível variável ambiental envolvida na etiologia da FP (ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997). No entanto, após este período, o ChHV5 foi detectado em Fernando de Noronha/PE em secreção oral de tartaruga-verde sem tumores (GATTAMORTA, 2015), tendo ainda sido descrita e confirmada por avaliação histopatológica e molecular a presença da doença com manifestação clínica na mesma região (GATTAMORTA et al., 2018).

De acordo com a literatura, a indicação de baixas prevalências em regiões de Ilhas está relacionada ao fato destas serem ambientes que possuem menor interferência humana e desenvolvimento (HERBST; KLEIN, 1995). As regiões de Alcatrazes/SP e Ilha Bela são Arquipélagos, sendo que Alcatrazes/SP possui menor interferência antrópica devido à restrição de atividades como turismo (ICMBIO, 2017). No entanto, estas regiões estão sujeitas às mesmas condições ambientais dos demais locais estudados, o que pode ser um fator contribuinte para o desenvolvimento da doença, tendo em vista as atividades econômicas desenvolvidas e a exposição dos indivíduos aos compostos citados. No Arquipélago de Alcatrazes/SP, dados de expedições realizadas entre 2000 e 2001 demonstraram a prevalência de 23,3% (de 74 animais) das tartarugas-verdes capturadas acometidas pela FP (GALLO et al., 2002).

Baseado no citado até este ponto da discussão, a literatura aponta que a área estudada possui animais expostos aos compostos derivados das atividades econômicas desenvolvidas, os quais podem causar imunossupressão, que, por sua vez, pode contribuir para o desenvolvimento da FP (AGUIRRE et al., 1995).

Portanto, é possível que a doença esteja relacionada a um impacto ambiental desfavorável (HERBST; KLEIN, 1995; VAN HOUTAN; HARGROVE; BALAZS, 2010), o que evidencia a importância da proteção destas áreas de alimentação e desenvolvimento, onde as tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) residem por um período (AMOROCHO; REINA, 2007).

Em relação à origem, a maior parte dos animais foram capturados incidentalmente na pesca (Tabela 4). Dados de capturas, presentes no estudo realizado em Ubatuba/SP por Gallo e colaboradores (2006), demonstraram alta prevalência da espécie *Chelonia mydas* na região, indicando que esta é uma área de desenvolvimento da espécie, e que a forma de captura mais frequente demonstrada foi a incidental na pesca, principalmente por métodos artesanais. Estes dados corroboram com os de origem presentes neste estudo.

5.2 AVALIAÇÃO MOLECULAR

No presente estudo, a detecção do ChHV5 foi realizada por meio da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) de pele, tumores externo e interno e pulmões, bem como através da técnica de hibridização *in situ* em amostragem de tumores externos.

5.2.1 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

De acordo com o que foi apresentado anteriormente nas descrições de obtenção de amostras, foram avaliadas 42 amostras de tumores externos, 1 amostra de tumor interno encontrada em exame necroscópico em pulmões, 27 amostras de pulmões, e 50 amostras de peles, provenientes dos 53 espécimes deste estudo.

A técnica de reação em cadeia pela polimerase qualitativa foi utilizada para a detecção do ChHV5. A metodologia foi baseada em três genes-alvo do ChHV5, que possuem diferentes tamanhos, como descrito na literatura: F-US3B ~700pb (GATTAMORTA, 2015), GTHV possui ~ 480pb (QUACKENBUSH et al., 2001), e UL-18 ~140pb (ALFARO-NUNEZ; GILBERT, 2014). No estudo de Alfaro-Nunez; Gilbert (2014), a sensibilidade de vários ensaios de PCR alternativos para detectar o ChHV5 foi comparada a fim de recomendar um método adequado para avaliar a prevalência viral em amostras tumorais e não tumorais de tartarugas-marinhas.

Segundo este estudo, fragmentos pequenos são normalmente utilizados para diagnóstico devido à maior sensibilidade de detecção quando comparados a fragmentos maiores. De acordo com o descrito (ALFARO-NUNEZ; GILBERT, 2014) e com as metodologias utilizadas em estudos no Brasil (RODENBUSCH et al., 2012, 2014; GATTAMORTA, 2015; MONEZI et al., 2016), neste estudo foram utilizados diferentes *primers* de diferentes tamanhos com a finalidade de garantir sensibilidade à metodologia.

As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram resultado positivo na detecção do ChHV5 para pelo menos um destes três genes avaliados. Em relação à avaliação por indivíduos, foram considerados positivos aqueles que apresentaram resultado positivo na detecção do ChHV5 para pelo menos um dos tecidos avaliados correspondentes.

5.2.1.1 Detecção de ChHV5 nas amostras de tumores externo e interno, pele e pulmões.

A tabela 5 apresenta os resultados obtidos neste estudo com relação à detecção do ChHV5, indicando sua presença nas amostras avaliadas de tumores externo e interno, pele e pulmões. As amostras que revelaram bandas do tamanho de fragmento de cada gene e estavam de acordo com o controle positivo foram consideradas positivas para a reação de PCR.

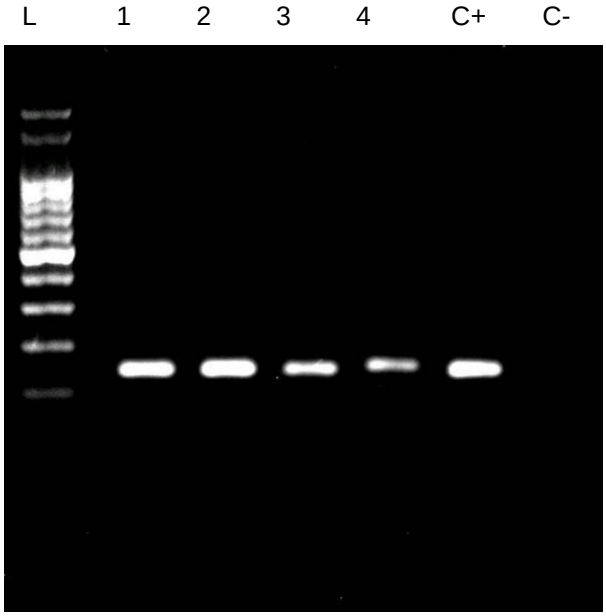
As Figuras 6, 7 e 8 apresentam os produtos de amplificação da proteína de capsídeo gene UL18 (Figura 6), da DNA polimerase de ChHV5 (Figura 7), e de similar a uma serina/treonina quinase (Figura 8) em uma parcela das amostras estudadas.

Tabela 5. Detecção de ChHV5 nas amostras de tumor externo, tumor interno, pele e pulmões dos espécimes acometidos e não acometidos pela fibropapilomatose.

FP+/-[1]	Tumor externo	Tumor interno	Pele	Pulmões
FP+	85,71%(36/42)	100% (1/1)	75% (24/32)	92,30%(12/13)
FP-	SA[2]	SA[2]	27,77% (5/18)	100% (14/14)
Total	85,71%(36/42)	100% (1/1)	58% (29/50)	96,29% (26/27)

Fonte: (Elaborado pelo autor).
[1]FP+/FP- acometidos pela FP e não acometidos pela FP; [2] sem amostragem.

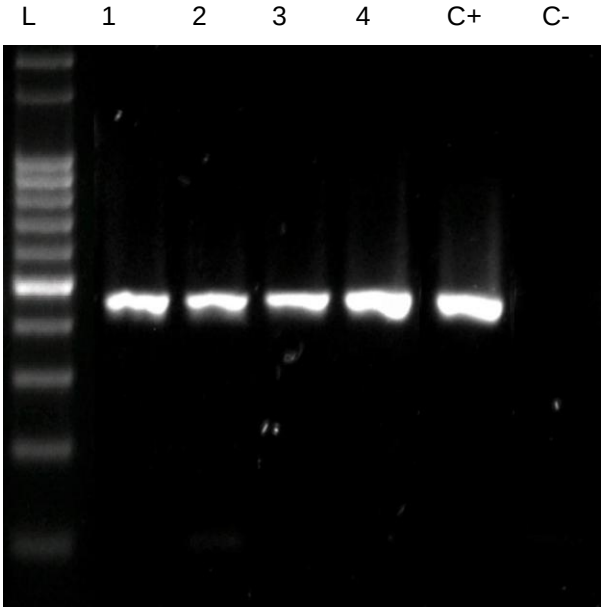
Figura 6. Detecção dos produtos amplificados em pele, pulmões e tumores interno e externo de *Chelonia mydas* para proteína de capsídeo gene UL18 (140pb) em gel de agarose 2%.



L: ladder 100pb; 1: tumor 5; 2: pele 7; 3: pulmão 9 ;4: pele 19; C+: controle positivo; C- controle negativo.

Fonte: Arquivo pessoal Roberta R Zamana.

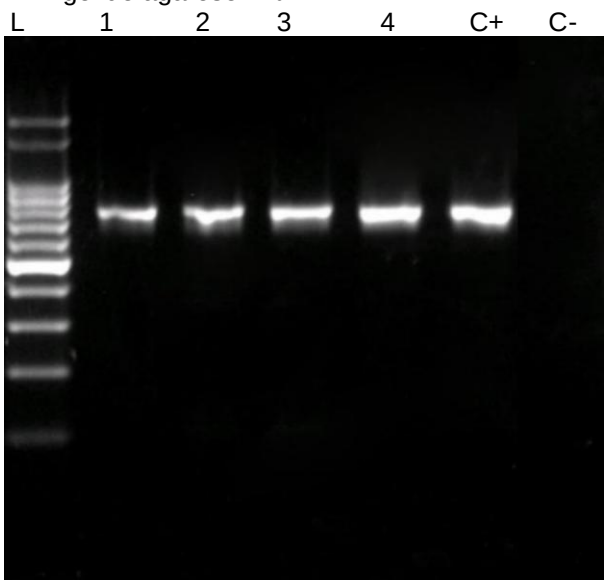
Figura 7. Detecção dos produtos amplificados em pele, pulmões e tumores interno e externo de *Chelonia mydas* para DNA polimerase (480pb) em gel de agarose 2%.



L: ladder 100pb; 1: tumor 14; 2: tumor 15; 3: pele 16; 4: pulmão 13; C+: controle positivo; C- controle negativo

Fonte: Arquivo pessoal Roberta R Zamana.

Figura 8. Detecção dos produtos amplificados em pele, pulmões e tumor interno e externo de *Chelonia mydas* para F-US3B (700pb) em gel de agarose 2%.



L: ladder 100pb; 1: pulmão 46; 2: pulmão 47; 3: Pele 53; 4: tumor 21; C+: controle positivo; C-: controle negativo.

Fonte: Arquivo pessoal Roberta R Zamana.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram prevalência de ChHV5 em 85,71% (36/42) dos tumores externos (Tabela 5). Monezi et al. (2016), em estudo realizado em Ubatuba/SP, demonstraram prevalência de 58,14% (25/43). Entretanto, esta diferença pode ser devida às metodologias utilizadas. Em ambos, foi utilizada a reação em cadeia pela polimerase qualitativa. Neste estudo, diferentes *primers* de diferentes tamanhos foram utilizados. No estudo de Monezi et al. (2016), a detecção foi realizada de acordo com a metodologia de Lu et al. (2000), baseada somente na região de DNA polimerase do vírus, o que pode resultar em uma menor sensibilidade da técnica empregada.

A literatura referente à manifestação clínica da FP nos casos presentes no Brasil não relata a ocorrência frequente de tumores internos, o que, segundo Herbst, (1994) é o esperado. Entretanto, há registros de tumores internos em pulmões, coração e rins em *Chelonia mydas* que apresentavam tumores externos no litoral sul de São Paulo (DUTRA; NASCIMENTO; FUTEMA, 2012), sendo observados também em cavidade oral e esôfago de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) provenientes do Espírito Santo (ROSSI et al., 2016), e em pulmões, pele e estômago das encontradas em Pernambuco (BRITO et al., 2004).

No presente estudo, foi encontrado um tumor interno em pulmões de uma *Chelonia mydas* acometida pela FP, e a prevalência de ChHV5 demonstrada foi de 100% (1/1) (Tabela 5). Estudos realizados no Havaí, na Flórida e em Porto Rico demonstraram que tumores internos são observados com maior frequência em pulmões, seguido de rins e coração (HERBST, 1994; WILLIAMS et al., 1994; AGUIRRE et al., 1998). Work et al. (2004), em estudo retrospectivo de casos, observou a presença de tumores internos em 39% dos casos (99/255). A prevalência de detecção alta neste tipo de lesão apresentada neste estudo foi devida ao baixo número amostral.

A detecção do ChHV5 no tumor interno neste estudo sugere a associação do vírus com a lesão, assim como descrito por Lu et al. (2000). No Brasil, os estudos citados descrevem a presença de tumor interno baseado nos achados necroscópicos e avaliações histopatológicas, não realizando a detecção molecular do ChHV5. Dessa forma, a detecção do ChHV5 em tumor interno pulmonar e sua futura caracterização molecular pode contribuir para o entendimento dos tipos de alterações e a possível relação com as variantes virais que ocorrem no Brasil, uma

vez que estudos moleculares com espécimes do Havaí e da Flórida sugerem que a diferença na manifestação clínica da FP está associada a diferentes variantes virais encontradas na região (MORRISON et al., 2018).

A detecção do ChHV5 já foi relatada em pele de indivíduos não acometidos e de indivíduos acometidos pela FP (ALFARO-NUNEZ et al., 2014; ALFARO-NUNEZ et al., 2016). Neste estudo, o ChHV5 foi detectado em 58% (29/50) das amostras de pele, observando a detecção em 75% (24/32) das amostras procedentes dos indivíduos acometidos pela FP, e 27,77% (5/18) nas dos não acometidos (Tabela 5).

No Brasil, Gattamorta (2015) demonstrou em Ubatuba/SP a prevalência de 37,03% (10/27) em pele dos indivíduos acometidos, no período de 2012 a 2014. A metodologia de detecção do ChHV5 em pele no estudo de Gattamorta (2015) foi baseada em duas regiões alvo, utilizando *primers* de tamanhos diferentes, 480pb e 700pb. A detecção do ChHV5 no presente estudo, além destes dois *primers*, utilizou o *primer* UL18 de aproximadamente 140pb. Assim, esta diferença na prevalência: 1) pode ser devida à metodologia empregada, sugerindo que a metodologia deste estudo foi mais sensível à detecção; 2) indica aumento na prevalência de ChHV5 em pele de animais acometidos pela FP na região.

A hipótese 1 foi testada comparando a prevalência de detecção do ChHV5 em pele de indivíduos acometidos, considerando a metodologia utilizada por Gattamorta (2015). Sendo assim, em vez de 75% (24/32) a prevalência cairia para 71,87% (23/32), demonstrando que, dentre os estudos, a metodologia não altera de forma significativa a prevalência. Entretanto, Alfaro-Nunez; Gilbert (2014), demonstraram em seu estudo que a utilização de *primers* de tamanhos menores resultam no aumento da sensibilidade da técnica.

Em animais não acometidos pela FP, a prevalência de ChHV5 em pele foi de 27,77% (5/18). No Brasil, Gattamorta (2015) detectou a presença de ChHV5 em 9,56% das amostras de pele de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) não acometidas pela FP que são provenientes de diferentes localidades do Brasil, e em 45,83% (11/24) das procedentes de Ubatuba/SP.

De acordo com Quackenbush et al. (2001), a presença de ChHV5 em pele de animais não acometidos pela FP representa um estágio inicial da infecção, sugerindo que estes indivíduos irão desenvolver a doença. No entanto, Alfaro-Nunez et al. (2016), considerando a detecção do vírus em pele de indivíduos acometidos e não acometidos pela FP, assim como descrito neste estudo, sugere que a detecção

de ChHV5 na pele de indivíduos que não apresentam tecidos tumorais externos indica infecção latente, como observado em demais herpesvirus.

A prevalência de ChHV5 em pulmões encontrada neste estudo foi de 92,30% (12/13) em indivíduos acometidos pela FP e 100% (14/14) em indivíduos não acometidos (Tabela 5). A detecção do ChHV5 em pulmões de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) acometidas pela FP foi descrita por demais estudos em outras regiões, mesmo com a ausência de lesões (LU et al., 2000). A prevalência de ChHV5 em pulmões de espécimes não acometidos, descrita neste estudo, foi próxima da demonstrada por Lu et al. (2000), de 90% (17/19). No entanto, estudos que demonstraram a presença de ChHV5 em pulmões de tartarugas-marinhas que não apresentaram tumores externos não foram encontrados.

Lu et al. (2000) e Page Karjian et al. (2017) pesquisaram a presença de ChHV5 em pulmões de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) não acometidas pela FP; no entanto, esta não foi detectada.

No estudo de Work et al. (2014), foi sugerida a latência em diferentes sítios anatômicos. Em demais infecções causadas por alphaherpesvirus, como pelo *Equine herpesvirus 1* (EHV-1), a presença do alphaherpesvirus foi detectada em pulmões, fígado e baço (MESQUITA et al., 2017a). Considerando estes estudos e os resultados encontrados, sugere-se que os pulmões podem ser um local de persistência do ChHV5 por infecção latente.

Os resultados aqui descritos indicam a prevalência e a detecção de ChHV5 nos tecidos estudados. A detecção em tumores evidencia a associação do ChHV5 com os tecidos tumorais, sugerindo este como o agente etiológico primário da FP, assim como descrito em demais estudos (PAGE-KARJIAN et al., 2017).

A presença do vírus em tecidos clinicamente sadios sustenta a hipótese descrita por Alfaro-Nunez et al. (2016). Segundo os autores, o ChHV5 é onipresente, com características de latência que exigem co-fatores – possivelmente ambientais ou relacionados à imunidade – para induzir FP.

Estes resultados demonstraram a detecção do ChHV5 na região estudada com abordagem em diferentes tecidos, entre eles os pulmões em indivíduos não acometidos não descritos até o momento na literatura, contribuindo para estudos de detecção e prevalência deste agente na região.

5.2.1.2 Prevalência de ChHV5 em indivíduos acometidos e não acometidos pela fibropapilomatose.

A prevalência de ChHV5 nos indivíduos avaliados neste estudo foi de 94,33% (50/53), correspondendo a 100% (35/35) dos indivíduos acometidos pela FP e 83,33% (15/18) dos não acometidos. Estes resultados foram apresentados na Tabela 6. Neste estudo, um indivíduo foi considerado positivo para a detecção do ChHV5 quando este foi detectado em um dos tecidos avaliados.

Tabela 6. Resultados positivos na detecção de ChHV5 em indivíduos de *Chelonia mydas* acometidos e não acometidos pela FP em relação às análises amostrais correspondentes aos tecidos obtidos.

Análises amostrais	[1]n de indivíduos positivos		% de indivíduos positivos	
	[2]FP+	[3]FP-	[2]FP+	[3]FP-
Tumor externo	03/03	[4]SA	100%	[4]SA
Pele	[4]SA	01/04	[4]SA	25%
Tumor externo+Pele	19/19	[4]SA	100%	[4]SA
Tumor externo +Pele+Pulmões	11/11	[4]SA	100%	[4]SA
Pele+Pulmões	1/1	14/14	100%	100%
Tumor externo+ tumor interno+ pele+ pulmões	1/1	[4]SA	100%	[4]SA
Total	50/53		94,33%	

Fonte: (Elaborado pelo autor).
[1] número de indivíduos; [2] acometidos pela FP; [3] não acometidos pela FP; [4] sem amostragem.

No estudo realizado por Gattamorta (2015), a prevalência de detecção de ChHV5 em indivíduos demonstrada em Ubatuba/SP foi de 74,51% (38/51). Ambos os estudos foram realizados sob as mesmas condições de coleta. Entretanto, para a

determinação da prevalência, os estudos utilizaram diferentes tecidos, o que pode ter resultado nesta diferença.

As prevalências aqui descritas encontradas neste estudo foram baseadas nos resultados de detecção do ChHV5 em pele, tumores e pulmões, utilizando PCR qualitativo para três *primers*: GTHV, F-US3B e UL18. Já o estudo de Gattamorta (2015), baseado nos objetivos de seu trabalho, determinou a prevalência com base em amostras de pele e tumor. Utilizou-se a mesma metodologia deste estudo, entretanto, com dois *primers*: GTHV e F-US3B.

Utilizando a metodologia de Gattamorta (2015) nos dados deste estudo, a prevalência da fibropapilomatose seria de 73,58% (39/53), correspondendo a 100% dos indivíduos acometidos (35/35) e 22,22% (4/18) dos não acometidos pela FP. Isso demonstra prevalências muito próximas entre os estudos. Considerando estas análises, sugere-se que: 1) assim como descrito por Alfaro; Gilbert (2014) e Alfaro-Nunez et al. (2016), metodologias que utilizam *primers* menores – como o UL 18 (140pb) –, em comparação com aquelas que utilizam *primers* maiores – como o F-US3B (700pb) e GTHV (480pb) –, demonstram maior sensibilidade para a detecção do ChHV5; 2) os pulmões, particularmente quando comparados com pele, são um método de diagnóstico ideal para a detecção do ChHV5.

A alta prevalência de indivíduos portadores do ChHV5, demonstrada neste estudo, sustenta o caráter multifatorial da doença e de latência do ChHV5 (ALFARO-NUNEZ et al., 2016), e indica ainda 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 excreção do vírus – considerando a detecção destes em *swabs* nasais, oculares e orais (GATTAMORTA, 2015; MONEZI et al., 2016; CHAVES et al., 2017).

5.2.1.3 Detecção do ChHV5 em indivíduos: análise conjunta dos resultados referente aos tecidos estudados.

Foram realizadas análises conjuntas do resultado de detecção do ChHV5 em um mesmo indivíduo, considerando a análise positiva, quando o ChHV5 foi detectado em pelo menos um dos tecidos avaliados. Isso determinou a prevalência de ChHV5 nesses indivíduos, já descrita no tópico anterior.

Dentre as amostras obtidas de tumor externo e pele, a maioria (42,10%; 8/19) apresentou resultado positivo em ambos os tecidos avaliados, seguido por indivíduos que apresentaram tumor externo positivo e pele negativa (31,57%; 6/19) e tumor externo negativo e pele positiva (26,31%; 5/19).

Segundo Quackenbush et al. (2001), a detecção do ChHV5 em pele de indivíduos não acometidos sugere que estes irão desenvolver a doença. A presença do vírus em ambos os tecidos avaliados, descrita neste trabalho, pressupõe que estes apresentavam o vírus em pele, antes mesmo de desenvolverem a lesão, com base no demonstrado por Quackenbush et al. (2001). Entretanto, foi observada uma menor frequência da presença do vírus em tecidos tumorais e ausência em pele. Alfaro-Nunez et al. (2016) demonstraram em seu estudo maior carga viral em pele de indivíduos que não apresentavam tumores externos do que naqueles que apresentavam. Considerando estes fatos, diferentes hipóteses foram formuladas: 1) o estudo de Alfaro-Nunez et al. (2016) detectou o vírus através de PCR quantitativo e o presente estudo PCR qualitativo. Devido à sensibilidade maior (RODENBUSCH et al., 2014) da técnica empregada por Alfaro-Nunez et al. (2016) e à menor carga viral em pele de indivíduos acometidos, a técnica utilizada neste estudo pode não ter detectado a presença do vírus; 2) Alfaro-Nunez et al. (2016) podem ter observado animais que estavam numa fase inicial de infecção, demonstrando maior carga viral em pele. A não presença em tumores e a presença em pele pode ter ocorrido devido à diferença de cargas virais em diferentes regiões dos tumores, como descrito por Greenblatt et al. (2004), demonstrando baixo número de cópias virais em derme profunda – o que pode resultar em não detecção em decorrência da técnica utilizada.

Dentre as amostras obtidas de pele e pulmões, no único indivíduo acometido pela FP que não possuía amostras de tumores, foi observado resultado positivo em ambos tecidos. Nos indivíduos não acometidos, a maioria (71,42%; 10/14) apresentou resultado negativo na pele e positivo nos pulmões, seguido por indivíduos que foram positivos em ambos os tecidos (28,57%; 4/14). Não foi observado resultado positivo para pele e negativo para os pulmões.

A detecção de alphaherpesvirus em pulmões foi descrita à partir de infecção experimental através da inoculação intranasal em outras alphaherpesviroses (MESQUITA et al., 2017a). Em tartarugas-marinhas, o ChHV5 foi detectado em secreções orais de indivíduos não acometidos pela FP (GATTAMORTA, 2015) e em

swabs nasais, orais e oculares de indivíduos acometidos (CHAVES et al., 2017). Isso sugere que esta pode ser uma via direta de infecção (GATTAMORTA, 2015; MONEZI et al., 2016; CHAVES et al., 2017), levando em consideração a proximidade anatômica das regiões nasal, oral e ocular (WYNEKEN, 2001; CHAVES et al., 2017). Porém, tanto em infecções por ChHV5 como por outros alphaherpesvirus, foi demonstrada a presença em demais órgãos não avaliados neste estudo, como rins, nervos cranianos e tecidos linfoides, demonstrando a presença de persistência viral por infecção latente em diferentes sítios anatômicos (CHEN; HUDNALL, 2006; GILDEN et al., 2011). Assim, devido ao fato dos demais órgãos não terem sido avaliados neste estudo, esta hipótese não pode ser descartada.

Ao analisar os resultados dos indivíduos que possuíam amostras de tumores, pele e pulmões, observou-se que a maioria (72,72%;8/11) apresentou resultado positivo para detecção de alphaherpesvirus em todos os tecidos; observou-se ainda sua presença em pulmões e ausência em tumor e pele em 9,09% dos indivíduos (1/11); e, por fim, sua presença em tumor e pulmão e ausência em pele em 9,09% deles (1/11). Considerando esses resultados, a hipótese de que os pulmões podem ser um local de infecção primária é sustentada. Entretanto, também foi observada, em menor frequência, a presença do vírus em pele e ausência em pulmões (9,09%;1/11) em indivíduo acometido, sustentando a hipótese de que os pulmões podem ser um local de persistência viral.

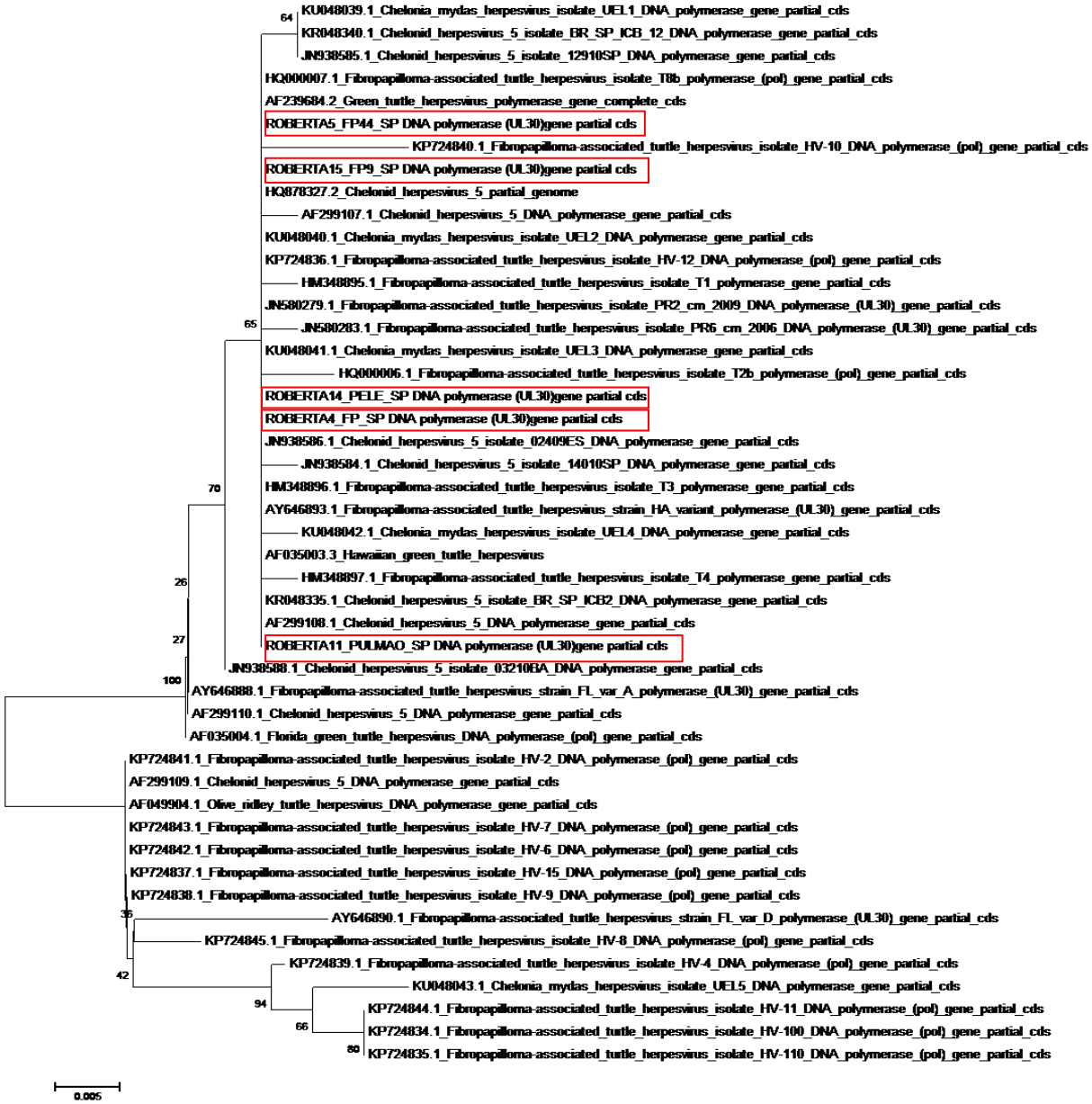
Os resultados descritos neste estudo referentes à detecção do ChHV5 em pulmões de indivíduos não acometidos pela FP e à análise conjunta de detecção nesses diferentes tecidos não foram, até então, descritos na literatura, contribuindo para futuros estudos sobre a patogenia e métodos de detecção e prevalência do vírus. No entanto, indicam a necessidade de mais estudos, objetivando a detecção do ChHV5 em demais sítios anatômicos de um mesmo indivíduo.

Cabe ressaltar que a metodologia utilizada neste estudo para a detecção apresenta limitações; no entanto, devido às dificuldades encontradas para o isolamento e cultivo do vírus, estudos moleculares são a melhor alternativa e metodologia empregadas. Sugere-se, para próximos estudos, o emprego de metodologias moleculares que permitam responder se está ocorrendo ou não a replicação do ChHV5 nos diferentes tecidos de um mesmo indivíduo, contribuindo para a elucidação de aspectos relacionados à patogênese da fibropapilomatose.

5.2.2 Caracterização molecular do ChHV5

Produtos amplificados para a DNA polimerase de ChHV5 foram submetidos a sequenciamento em laboratório especializado. A Figura 9 demonstra as relações filogenéticas obtidas entre as sequências detectadas neste estudo, àquelas provenientes de estudos anteriores.

Figura 9. Análise filogenética de sequências de 359 pb da DNA polimerase de ChHV5 em pele, tumor epitelial e pulmão de *Chelonia mydas* no litoral de São Paulo. A árvore foi gerada pelo método de Neighbor-joining, modelo Kamura 2-parâmetros, com 1000 repetições de bootstrap. Em vermelho, as sequências obtidas neste estudo.



Fonte: (Elaborado nesse estudo).

Para avaliar a identidade entre as sequências identificadas neste estudo e àquelas obtidas no Genbank, foram analisados fragmentos do genoma parcial da DNA polimerase do ChHV5. Foi possível observar que para fragmentos de 359pb, a identidade das sequências obtidas neste estudo, foi de 100% com as sequências provenientes de Porto Rico (JN580279), Espírito Santo/Brasil (JN938586), São Paulo/Brasil (KR048335) e Paraná/ Brasil (KU048040). Além, das sequências apresentarem 100% de identidade entre si.

As sequências analisadas são provenientes de tumores externos, pele e pulmões de diferentes indivíduos acometidos pela FP, no entanto, os pulmões não apresentavam tumores. Esses resultados demonstram que a sequência presente em pele e tecidos tumorais, também está presente nos pulmões, ou seja, indicando que um mesmo haplótipo do ChHV5 é capaz de infectar diferentes tecidos, o que é descrito em demais infecções por alphaherpesvirus em que uma mesma variante é encontrada em diferentes órgãos (MESQUITA et al., 2017a).

Assim como descrito por demais estudos realizados no Brasil (RODENBUSCH et al., 2014; GATTAMORTA, 2015; MONEZI et al., 2016), observa-se que o haplótipo viral encontrado neste estudo, circula pelo litoral Sul e Sudeste brasileiro, podendo ser encontrado desde o Espírito Santo até o Paraná.

5.2.3 Hibridização *in situ*

Das 42 amostras de tumores externos provenientes dos 35 indivíduos acometidos pela FP deste estudo, oito – correspondendo a uma amostragem de 19,04% (8/42) – foram submetidos à técnica de hibridização *in situ*. Os resultados foram apresentados no Quadro 2.

A hibridização *in situ* permite determinar a localização e distribuição do ChHV5, enquanto a PCR utilizada neste estudo permite, de forma qualitativa, a detecção do ChHV5. As amostras positivas na hibridização *in situ* apresentaram marcação no núcleo de células epiteliais (Figura 10), como o demonstrado por Kang et al. (2008), particularmente em regiões contendo corpúsculos de inclusão intranucleares.

Não foi detectada marcação, assim como no estudo de Kang et al. (2008), em tecido conjuntivo subepitelial em nenhum dos resultados positivos. Isto pode não significar uma ausência total de vírus nestas regiões, mas é possível que indique

que a sensibilidade da técnica de hibridização *in situ* não é adequada para detecção do vírus nestas regiões, com base em estudos como de Greenblatt et al. (2004). O estudo mencionado indica baixo número de cópias virais em derme profunda, demonstrado também por Work et al. (2014).

Assim como no estudo de Kang et al. (2008), corpúsculos de inclusão intranucleares não foram detectados em fibromas, mas sim em fibropapilomas – em sua maioria, com a presença de degeneração balonosa, sugerindo maior atividade viral nesse tipo de lesão tumoral.

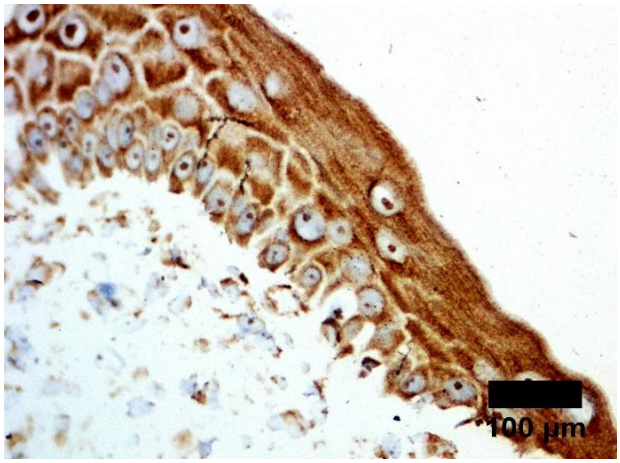
Analisando em conjunto os resultados de hibridização *in situ* e PCR, três casos negativos na hibridização *in situ* (Figura 11) foram positivos para PCR. A metodologia para a confecção da *probe* foi feita de acordo com o estudo de Kang et al. (2008), sendo confeccionada com base na região UL30 correspondente ao gene da polimerase do herpesvirus, por ser um dos primeiros genes expressos durante a replicação viral (ROIZMAN; SEARS, 1996). Neste estudo, um dos *primers* utilizados na PCR compreende esta região (GTHV). Assim, com a finalidade de comparação das metodologias empregadas, foram apresentados os resultados obtidos na PCR no Quadro 2.

Quadro 2. Caracterização histopatológica, alterações e resultados das técnicas de PCR e hibridização *in situ* provenientes de oito indivíduos acometidos pela fibropapilomatose.

Tumores externos	Caracterização histopatológica	Alterações Histopatológicas			Resultado ISH	Resultado PCR		
						GTHV	F-US3B	UL18
		[1]DB	[2]CI	[3]PA				
1	Fibropapiloma	[4]X	[4]X	[5]NE	Positivo	+	+	+
2	Fibropapiloma	[5]NE	[5]NE	[5]NE	Positivo	+	-	+
3	Fibropapiloma	[5]NE	[5]NE	[5]NE	Positivo	+	-	-
4	Fibropapiloma	[5]NE	[5]NE	[5]NE	Negativo	+	-	-
5	Fibropapiloma	[5]NE	[5]NE	[4]X	Positivo	+	+	-
6	Fibropapiloma	[5]NE	[5]NE	[4]X	Negativo	+	-	-
7	Papiloma/ Fibropapiloma	[5]NE	[5]NE	[5]NE	Negativo	+	-	-
8	Fibroma	[5]NE	[5]NE	[4]X	Negativo	-	-	-

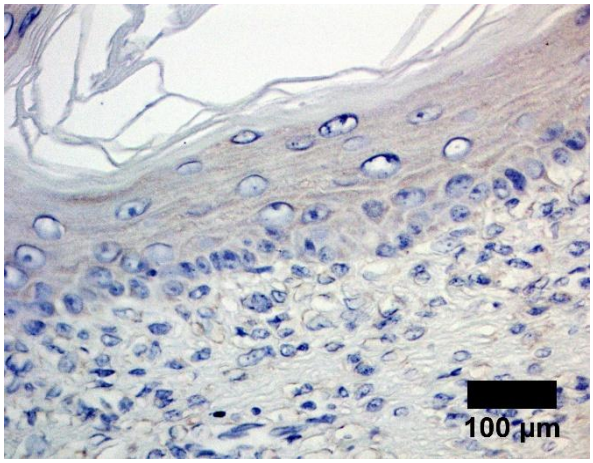
Fonte: (Elaborado pelo autor)
[1] degeneração balonosa; [2] corpúsculo de inclusão; [3] parasita; [4] presença; [5] não encontrado.

Figura 10. Resultado positivo, demonstrando marcação (coloração marrom) no núcleo das células. ISH. 40X.



Fonte: Arquivo pessoal Roberta R Zamana.

Figura 11. Resultado negativo, não há a marcação (coloração marrom) no núcleo das células. ISH. 40X.



Fonte: Arquivo pessoal Roberta R Zamana.

Comparando a sensibilidade das técnicas empregadas, amostras negativas na hibridização *in situ* foram positivas no PCR, o que também foi demonstrado por Kang et al. (2008). Isso sugere que a PCR é mais sensível à detecção do ChHV5 do que a hibridização *in situ*, e isso pode estar relacionado ao nível de carga viral. No entanto, os resultados apresentados na hibridização *in situ* demonstram a associação do ChHV5 com a lesão, apontado também por estudos moleculares (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; RODENBUSH et al., 2014; GATTAMORTA, 2015; MONEZI et al., 2016).

A literatura científica relata o possível envolvimento de parasitas na transmissão da fibropapilomatose. Parasitas da família Spirorchiidae são comuns no sistema cardiovascular em tartarugas-marinhas, sendo encontrados frequentemente nas lesões de FP. No entanto, é improvável que desempenhem um papel no desenvolvimento da FP (KANG et al., 2008). Em um dos resultados positivos na hibridização, foi observada em microscopia ótica a presença de ovos de trematódeos; porém, não houve marcação nesta região, e sim na região epitelial, sugerindo a não participação destes no desenvolvimento da FP (KANG et al., 2008).

5.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

5.3.1 Tumores externos

Foram avaliados 38 tumores externos (100 %) provenientes dos indivíduos acometidos pela FP. Com base nas caracteristicas histológicas e no descrito na literatura (MATUSHIMA et al., 2001), os tecidos tumorais foram caracterizados em papilomas, fbropapilomas e fibromas. A tabela 7 apresenta a síntese dos resultados.

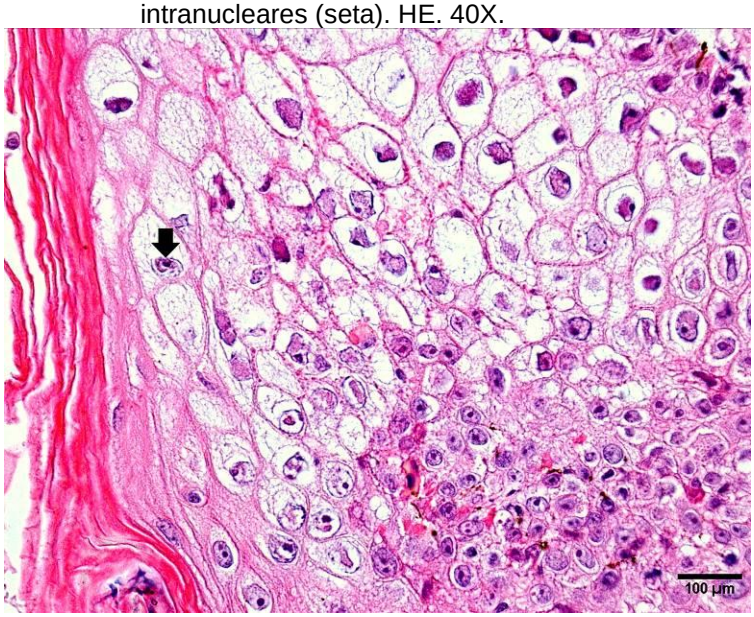
Os resultados demonstraram que a maioria dos tumores, correspondendo a 76,31% (29/38), foram classificados como fibropapilomas, seguido por papilomas (13,15%; 5/38), fibromas (7,89%; 3/38), e um único tumor classificado como papiloma/fibropapiloma (2,63%; 1/38). Em dois tumores, correspondendo a 5,26% (2/38), foi possível observar a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares e degeneração balonosa (Figura 12).

Tabela 7. Síntese dos resultados, apresentando a caracterização histopatológica dos tumores externos provenientes dos indivíduos de *Chelonia mydas* e os resultados correspondentes de achados histopatológicos e PCR.

Caracterização histopatológica	% tumores correspondentes	% Resultados positivos PCR	Achados histopatológicos		
			[1]DB	[2]CI	[3]PA
Fibropapiloma	76,31% (29/38)	82,75% (24/29)	6,89% (2/29)	6,89% (2/29)	37,93% (11/29)
Papiloma	13,15% (5/38)	100% (5/5)	0	0	20% (1/5)
Fibroma	7,89% (3/38)	66,66% (2/3)	0	0	66,66% (2/3)
Papiloma/ Fibropapiloma	2,63% (1/38)	100% (1/1)	0	0	0
Total	100% (38/38)	84,21% (32/38)	5,26% (2/38)	5,26% (2/38)	36,84% (14/38)

Fonte: (Elaborado pelo autor)
[1] degeneração balonosa; [2] corpúsculos de inclusão; [3] parasitas.

Figura 12. Degeneração balonosa e corpúsculos de inclusão intranucleares (seta). HE. 40X.



Fonte: Arquivo pessoal Roberta R Zamana.

Kang et al. (2008) demonstrou em seu estudo uma maior prevalência de tecidos tumorais caracterizados como fibropapilomas, com a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares em uma porcentagem de 16% dos tumores. Corpúsculos de inclusão intranucleares não foram observados em fibromas nem em papilomas. Rodenbusch et al. (2014) demonstrou em amostras provenientes de diferentes localidades do Brasil – entre elas, Ubatuba/SP – a prevalência de 77% das amostras classificadas como fibropapilomas, seguido por fibromas. Não foram encontrados papilomas, porém, observou-se a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares em 11% das amostras. Monezi et al. (2016), em seu estudo realizado em Ubatuba/SP, demonstrou a caracterização de 40,9% dos tecidos tumorais em fibropapilomas e 31,8% em papilomas, não encontrando fibromas e observando a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares em 40,9% dos casos. Neste estudo, assim como em todos os citados, foi demonstrada maior prevalência de tecidos tumorais caracterizados como fibropapilomas.

Foi possível observar uma diferença entre os estudos em relação à frequência demonstrada de corpúsculos de inclusão intranucleares, sendo que este estudo apresentou menor frequência que os demais. Esta diferença apresentada entre os estudos indicados e o de Monezi et al. (2016) pode ter surgido devido à metodologia

utilizada. Monezi et al. (2016) realizou mais cortes histológicos de uma mesma amostra, aumentando, assim, a probabilidade de observar este achado.

Como descrito por Kang et al. (2008) e Monezi et al. (2016), a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares neste estudo foi observada em áreas com degeneração balonosa, sendo esses achados sugestivos de infecção viral (JACOBSON et al., 1989; LACKOVICH et al., 1999). A presença de corpúsculos de inclusão intranucleares e degeneração balonosa não foi observada em fibromas neste estudo, o que também foi descrito pelos demais estudos aqui citados (KANG et al., 2008; RODENBUSCH et al., 2014). Isso sugere que, ao comparar esses dois tipos de tumores, o fibropapiloma apresenta maior atividade viral do que o fibroma.

Dos 38 tumores avaliados, 32 (84,21%) obtiveram resultado positivo na PCR, observando-se a presença de ChHV5 em todos os diferentes tipos de tumores encontrados – assim como o descrito por Rodenbusch et al. (2014) e Monezi et al. (2016). Isso sugere a associação do ChHV5 à tecidos tumorais (JACOBSON et al.,1991; HERBST et al., 1995, LACKOVICH et al., 1999; QUACKENBUSH et al., 2001).

Em 36,84% (14/38) dos tumores foi observada a presença de parasitas, demonstrando uma maior frequência destes em fibromas, seguido por papilomas e fibropapilomas. Os parasitas observados corresponderam a ovos de trematódeos, presentes em vasos sanguíneos e/ou derme. Estes são provavelmente pertencentes à Família Spirorchiidae, assim como descrito por Kang et al. (2008), Zwarg et al. (2014) e Cruz-Ochoa (2017).

Trematódeos já foram sugeridos como possível agente etiológico da FP; no entanto, a ausência destes em estudos de infecção experimental indicam que são achados inespecíficos (HERBST et al., 1999) – além disso, há frequente presença de trematódeos em tartarugas-marinhas que não apresentam tumores externos (HERBST et al., 1999; KANG et al., 2008; ZWARG et al., 2014).

5.3.2 Tumor interno

Foi encontrada, em exame necroscópico, a presença de tumor interno em pulmões de um indivíduo de *Chelonia mydas* que veio a óbito acometido pela FP, caracterizado como fibroma por Cruz-Ochoa (2017). Essa lesão apresentou resultado positivo para a detecção do ChHV5.

Demais estudos realizados no Brasil demonstraram a presença de tumores internos, caracterizados como fibroma, em pulmões, coração e rins. No entanto, não foi realizada a detecção do ChHV5 e as características histológicas descritas diferem das encontradas na literatura em tumores internos no Havaí (DUTRA; NASCIMENTO; FUTEMA, 2012).

Em Pernambuco, nódulos viscerais caracterizados como fibromas foram descritos em pulmões, pele e estômago de *Chelonia mydas,* na porção mais próxima ao esôfago (BRITO et al., 2004). No estudo de Work et al. (2004), em que dados de necropsias realizadas em tartarugas-verdes do Havaí referentes a dez anos (1993 a 2003) foram analisados, demonstrou-se a presença de tumor interno em 39% dos casos (99/255), sendo os pulmões, coração e rins os órgãos mais afetados.

Este estudo sugere que esse tipo de lesão interna não é a forma mais frequente de manifestação clínica da doença no Brasil, tal como o descrito por Jacobson et al., (1989) e Herbst (1994). Assim, demonstram que há poucos relatos de tumores internos e suspeitam que estes estejam presentes na fase tardia da doença, considerados lesões crônicas (JACOBSON et al., 1989). A associação do ChHV5 a este tipo de lesão já foi descrita no Havaí (WORK et al., 2004), sendo agora descrita no Brasil neste estudo.

5.3.3 Pele

Foram avaliadas 16 amostras de pele; destas, 12 são provenientes de indivíduos acometidos pela FP e quatro, de indivíduos não acometidos. Achados histopatológicos foram observados nas amostras dos indivíduos acometidos pela FP, não sendo observados nas amostras dos indivíduos não acometidos.

As alterações observadas neste estudo corresponderam à presença de necrose em tecido muscular e granulomas parasitários, com a presença de ovos de trematódeos (Tabela 8). Kang et al. (2008), em seu estudo, analisou 104 amostras de pele e, assim como neste estudo, Kang et al. (2008) observou a presença de granulomas parasitários em pele de tartarugas que apresentavam lesão. No entanto, este tipo de achado também é descrito em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) não acometidas pela FP (WERNECK; SILVA, 2015). Devido ao número amostral avaliado e à diferença deste número entre as amostras de indivíduos acometidos (12/16) e de não acometidos pela doença (4/16), sugere-se que a não observação

deste tipo de alteração em pele de indivíduos não acometidos é devida a esta diferença de número amostral.

Tabela 8. Síntese dos resultados das alterações e achados histopatológicos em pele provenientes de indivíduos de *Chelonia mydas* acometidos e não acometidos pela FP.

+/- FP	n de amostras	Achados histopatológicos	Resultados positivos PCR
[1]+FP	12 (100%)	33,33% (4/12)	50% (6/12)
[2]-FP	4 (100%)	0	50% (2/4)

Fonte: (Elaborado pelo autor)
[1] acometidos pela FP; [2] não acometidos pela FP.

Em relação à detecção do ChHV5 neste tipo de amostra tecidual, como já citado no tópico de avaliação molecular, houve detecção em pele de indivíduos com a presença e ausência de tumores externos, como descrito por (ALFARO-NUNEZ et al., 2014; ALFARO-NUNEZ et al., 2016). Analisando os resultados em relação aos achados descritos e à detecção do vírus, este foi detectado tanto nas amostras que apresentavam alterações como nas amostras que não apresentavam.

Houve presença do vírus na única amostra que apresentou necrose de tecido muscular e em uma das três amostras que indicavam presença de ovos de trematódeos. A necrose em tecido muscular foi um achado inespecífico neste estudo, não sendo determinada a sua causa.

5.3.4 Pulmões

As avaliações histopatológicas dos pulmões provenientes de *Chelonia mydas* acometidas e não acometidas pela FP que vieram a óbito, descritas anteriormente, foram realizadas por Cruz-Ochoa (2017). Os diagnósticos histopatológicos foram apresentados nos Quadros 3 e 4. Neste tópico, os diagnósticos histopatológicos realizados nos pulmões foram comparados com os resultados de PCR para a detecção de ChHV5.

Quadro 3. Diagnóstico histopatológico em pulmões de *Chelonia mydas* acometidas pela fibropapilomatose e resultado da detecção de ChHV5 por PCR (n=13).

Pulmões	Diagnóstico histopatológico (Dx)	Resultado PCR
1	Pneumonia com vasculite granulomatosa e trombose.	Positivo
2	Pneumonia com vasculite granulomatosa parasitária severa e trombose.	Negativo
3	Broncopneumonia supurativa bacteriana com vasculite granulomatosa severa.	Positivo
4	Pneumonia com vasculite granulomatosa severa e fibroma pulmonar.	Positivo
5	Broncopneumonia supurativa bacteriana com vasculite granulomatosa severa.	Positivo
6	Broncopneumonia intersticial com vasculite granulomatosa severa.	Positivo
7	Pneumonia parasitária multifocal discreta.	Positivo
8	Pneumonia parasitária moderada.	Positivo
9	Pneumonia parasitária multifocal moderada.	Positivo
10	Congestão moderada.	Positivo
11	Pneumonia com vasculite granulomatosa leve.	Positivo
12	Broncopneumonia aguda leve.	Positivo
13	Broncopneumonia heterofílica severa generalizada com colônias bacterianas intralesionais de morfologia bacilar.	Positivo

Fonte: (Elaborado pelo autor)

Quadro 4. Diagnóstico histopatológico em pulmões de *Chelonia mydas* não acometidos pela FP e resultado na detecção de ChHV5 por PCR (n=13) (continua)

Pulmões	Diagnóstico histopatológico (Dx)	Resultado PCR
14	Broncopneumonia abscedativa bacteriana severa com hemorragia.	Positivo
15	Edema moderado. Hemorragias multifocais leves em faveolas. Congestão severa difusa.	Positivo
16	Pneumonia com vasculite granulomatosa e arterite verminótica.	Positivo
17	Broncopneumonia abscedativa com vasculite granulomatosa leve.	Positivo
18	Pneumonia com vasculite granulomatosa severa e trombose.	Positivo
19	Pneumonia intersticial com vasculite granulomatosa.	Positivo
20	Congestão e hemorragia severa.	Positivo
21	Pneumonia granulomatosa severa com vasculite granulomatosa severa.	Positivo
22	Pneumonia granulomatosa com vasculite leve-moderada.	Positivo
23	Broncopneumonia intersticial com hemorragia e verminose.	Positivo
24	Congestão e hemorragia em brônquios.	Positivo

(continuação)

Pulmões	Diagnóstico histopatológico (Dx)	Resultado PCR
25	Broncopneumonia abscedativa heterofílica severa focalmente extensa com colônias bacterianas de morfologia cocobacilar intralesionais e áreas de hemorragia pleural.	Positivo
26	Broncopneumonia intersticial abscedativa e granulomatosa bacteriana severa.	Positivo

Fonte: (Elaborado pelo autor)

Com base nos diagnósticos histopatológicos, foi possível observar que pneumonia e broncopneumonia corresponderam à maioria dos achados, representando 84,61% dos casos (Tabela 9) e sendo observadas em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) acometidas e não acometidas pela FP.

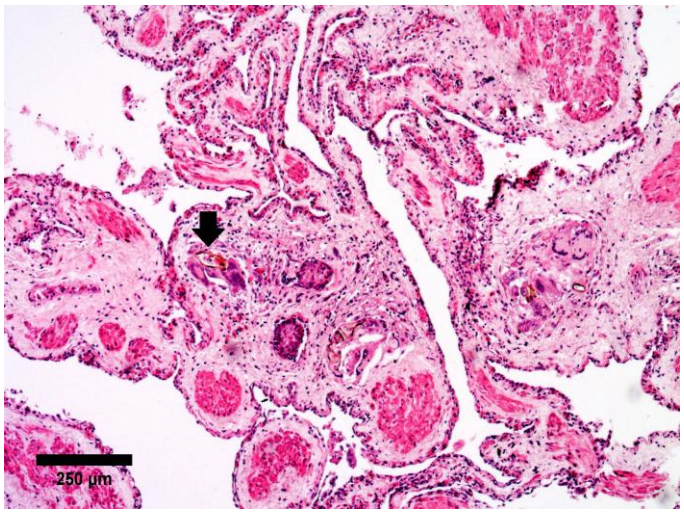
Nos dois grupos dos espécimes avaliados (acometidos e não acometidos pela FP), o diagnóstico mais frequente foi pneumonia parasitária (Figuras 13 e 14), correspondendo a 53,84% (7/13) dos casos dos não acometidos e 38,46% (5/13) dos acometidos pela FP (Tabela 9). Todos os casos de pneumonia e a maioria dos casos de broncopneumonia apresentados foram decorrentes da presença de agentes infecciosos, como trematódeos e colônias bacterianas, respectivamente. Outros achados, como congestão, edema e hemorragia, foram observados nos indivíduos estudados.

Tabela 9. Diagnóstico histopatológico em pulmões de *Chelonia mydas* acometidas e não acometidas pela FP, baseado na classificação em pneumonia, broncopneumonia e outras alterações, e apresentação dos resultados positivos para detecção de ChHV5 por PCR nas amostras de pulmões correspondentes.

+/- FP	Diagnóstico histopatológico (Dx) em pulmões			Resultado positivo para PCR		
	Pneumonia (1)	Broncopneumonia (2)	Outros achados (3)	1	2	3
+FP	53,84% (7/13)	38,46% (5/13)	7,69% (1/13)	85,71% (6/7)	100% (5/5)	100% (1/1)
-FP	38,46% (5/13)	38,46% (5/13)	23,07% (3/13)	100% (5/5)	100% (5/5)	100% (3/3)
total	46,15% (12/26)	38,46% (10/26)	15,38% (4/26)	91,66% (11/12)	100% (10/10)	100% (4/4)

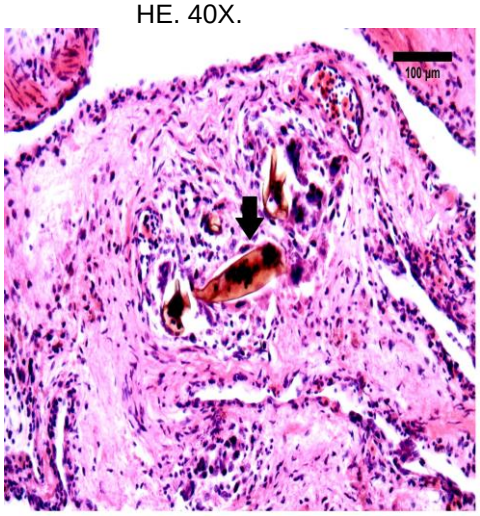
Fonte: (Elaborado pelo autor)

Figura 13. Pneumonia parasitária. A seta indica a presença do parasita. HE. 10X.



Fonte: Arquivo pessoal Roberta R Zamana.

Figura 14. Pneumonia parasitária. A seta indica a presença do parasita em maior aumento. HE. 40X.



Fonte: Arquivo pessoal Roberta R Zamana.

No Brasil, um estudo realizado em tartarugas-de-pente (*Eretmochelys imbricata*) demonstrou, referente aos achados em pulmões de 29 espécimes, a presença de alterações como broncopneumonia heterofílica, pneumonia granulomatosa parasitária causada por espirorquídeos, pneumonia granulomatosa bacteriana, pneumonia granulomatosa fúngica e congestão (SILVA et al., 2016). Assim como no presente estudo, estes achados indicam um predomínio de alterações como pneumonia e broncopneumonia. O predomínio é decorrente da presença de parasitas, em grande maioria trematódeos, mesmo avaliando diferentes espécies de tartarugas-marinhas. Isso também foi descrito em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*), demonstrando a presença de trematódeos em todos os órgãos. A maior frequência de trematódeos foi observada em baço, pulmões e subserosa gastrointestinal, ocasionando alterações – como as descritas por Silva et al. (2016) – em pulmões (GORDON; KELLY; CRIBB, 1998; FLINT et al., 2009) com a presença de agentes infecciosos (vírus, bactérias, fungos e parasitas) – como descrito por Flint et al. (2009).

Neste estudo, os indivíduos avaliados nesse tópico vieram a óbito durante o período de coleta, concomitante ao período de tratamento no Centro de Reabilitação. Isso corrobora com o estudo de Silva et al. (2016), revelando que estes tipos de alterações nos pulmões podem debilitar os animais, o que faz com que

encalhem; ou, após encalharem por motivos desconhecidos e serem submetidos ao tratamento, tornam-se suscetíveis a infecções pulmonares. No entanto, infecções causadas por fungos e bactérias são oportunistas e ocorrem quando os animais estão imunocomprometidos (ROSENTHAL; MADER, 2006), o que sugere que estes indivíduos que encalham não estão saudáveis e desenvolvem estes tipos de alterações em consequência da imunossupressão.

Em relação à detecção do ChHV5 nos pulmões, foi demonstrada a presença deste em 96,15% (25/26) dos casos. O único caso em que não houve detecção correspondeu à amostra de um indivíduo acometido pela FP, que apresentou pneumonia com vasculite granulomatosa parasitária severa e trombose. Cruz-Ochoa et al. (2017) demonstraram que não houve diferença significativa ao comparar a presença do vírus e achados como pneumonia parasitária entre animais acometidos e não acometidos pela FP, assim como sugere este presente estudo. Esses resultados sugerem que a presença do vírus não está associada a parasitas ou bactérias; porém, esta coinfecção pode estar relacionada à condição de imunossupressão dos espécimes, ou pode indicar o tropismo do ChHV5 pelos tecidos pulmonares, possivelmente sendo um local de persistência do ChHV5.

Considerando o contexto e os dados da literatura científica, este estudo pesquisou a presença do ChHV5 em pele, pulmões e tumores, quando presentes, em tartarugas-verdes procedentes do Litoral Norte do Estado de São Paulo, possibilitando a associação do vírus à tecidos tumorais e à possível relação com achados histopatológicos. Assim como já descrito em demais trabalhos de investigação molecular, foi observada a detecção do ChHV5 em indivíduos clinicamente sadios, indicando infecção latente e caráter multifatorial da doença. A análise dos resultados permitiu a formulação de hipóteses, contribuindo para a patogênese da doença; forneceu dados de prevalência, contribuindo para o monitoramento do agente na região estudada; e apresentou novos dados, não descritos em literatura, referente à presença do vírus em pulmões dos indivíduos não acometidos pela FP.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo utilizou diferentes técnicas, abrangendo fatores moleculares e histopatológicos, a fim de contribuir em aspectos epidemiológicos e relacionados à patogênese da fibropapilomatose. A detecção do ChHV5 em diferentes tecidos de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) já foi descrita tanto no Brasil, como no exterior.

Neste estudo, foi determinada a prevalência com dois enfoques: em nível de tecido e em nível de indivíduo. A maioria dos estudos realizados, inclusive no Brasil, avaliam a prevalência do ChHV5 em nível tecidual ou demais amostras biológicas, não avaliando o impacto sobre o indivíduo. No entanto, a avaliação do indivíduo permite a formulação de hipóteses sobre a patogênese da doença através da análise conjunta da presença ou ausência do vírus nos diferentes tecidos avaliados. Além disso, determina a prevalência de ChHV5, demonstrando a frequência de portadores do vírus na região estudada, mesmo na ausência de tecidos tumorais.

A detecção do vírus em tecidos e no indivíduo, bem como os resultados da hibridização *in situ* e a avaliação histopatológica, permitiram a associação do ChHV5 à tecidos tumorais. A presença do ChHV5 em tecidos e indivíduos clinicamente sadios demonstraram o caráter multifatorial da doença e infecção latente. Os resultados referentes à detecção do vírus em tecidos permitiram a comparação com as prevalências apresentadas por outros estudos na mesma região e com as metodologias empregadas, contribuindo para o monitoramento da presença do vírus na região e para o emprego de metodologias mais sensíveis.

Considerando as análises realizadas, os resultados encontrados em pulmões, particularmente em indivíduos não acometidos pela FP, e a alta prevalência demonstrada tanto nos espécimes acometidos como nos não acometidos contribuem para estudos futuros sobre a patogênese da doença. Sendo assim, os pulmões podem ser um local de persistência viral por infecção latente e/ou um local de infecção primária. Além disso, a inclusão deste órgão na avaliação alterou a frequência de indivíduos portadores, sendo responsável pela alta prevalência encontrada nesses animais.

Estudos futuros que avaliem demais órgãos em um mesmo indivíduo, visando a detecção e caracterização molecular do ChHV5, podem contribuir para responder questionamentos, como: Será que os pulmões realmente são um local de infecção

primária? O mesmo indivíduo pode ser infectado por diferentes variantes? A caracterização molecular pode sugerir em quais locais geográficos ocorreu a infecção?

Neste estudo, dificuldades foram encontradas no sequenciamento do ChHV5, principalmente nos tecidos não tumorais. Isto pode estar relacionado à característica de latência dos herpesvirus, associado a uma maior quantidade de DNA do hospedeiro em relação ao do vírus, resultando em baixas concentrações de DNA viral, o que interferiu no sequenciamento.

Entretanto, todas as diferentes avaliações realizadas neste estudo demonstraram a presença do agente e da doença na região. Devido à história de vida complexa das tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*), é difícil quantificar o impacto que a fibropapilomatose ocasiona na população destes indivíduos. No entanto, a presença em alta frequência de indivíduos portadores, o caráter multifatorial da FP, as ações antrópicas e as atividades econômicas desenvolvidas na região contribuem tanto para a manutenção do ChHV5 como para o desenvolvimento da forma clínica da doença. Sendo assim, mesmo perante a dificuldade de quantificar o impacto, a presença de um agente infeccioso interfere de maneira negativa em uma população.

Com isso, os resultados fornecem dados de prevalência que contribuem para o monitoramento do ChHV5 na região estudada e hipóteses que podem contribuir na elucidação de aspectos relacionados à patogênese da FP e direcionar futuras pesquisas, auxiliando na gestão da doença e conservação da espécie.

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**, v. 75, n. 10, p. 737-742, 1997.

AGUIRRE, A.A.; BALAZS, G.H.; ZIMMERMAN, B.; SPRAKER. T.R. Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. **Journal of Wildlife Diseases**, v.30, n.1, p.8-15, 1994.

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

AGUIRRE, A.A.; SPRAKER, T.R.; BALAZS, G.H.; ZIMMERMAN, B. 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.; SPRAKER, T.R.; CHAVES, A.; TOIT, L.; EURE, W.; BALAZS, G.H. Pathology of fibropapillomatosis in Olive Ridley turtles *Lepidochelys olivacea* nesting in Costa Rica. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.11, p.283-289, 1999.

AGUIRRE, A.A.; SPRAKER, T.R.; MORRIS, R.A.; POWERS, B.; PRINCIPE, B. Low grade fibrosarcoma's in green turtles: is fibropapillomatosis going amuck? IN:

Proceedings.... Philadelphia: PA.US Dept Commer NOOA Tech Memo NMFS-SEFSC, 2001.

ALFARO-NUNEZ, A.; BERTELSEN, M.F.; BOJESEN, A.M.; RASMUSSEN, I.; ZEPEDA-MENDOZA, L.; OLSEN, M.T.; GILBERT, M.T.P. Global distribution of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus among clinically healthy sea turtles. **BMC Evolutionary Biology**, v.14, n.206, p.1471-2148, 2014.

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

ALFARO-NUNEZ, A.; BOJESEN, A.M; BERTELSEN, M.F; WALES, N.; BALAZS, G.H; GILBERT, M.T.P. Further evidence of *Chelonid Herpesvirus 5* (ChHV5) latency: high levels of ChHV5 DNA detected in clinically healthy marine turtle. **Peer, J**, 2016.

ALMEIDA, P.A.; SANTOS, A.J.B.; THOMÉ, J.C.A.; BELINI, C.; BAPTISTOTTE, C.; MARCOVALDI, M.A.; SANTOS, A.S.; LOPEZ, M. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. **Revista Biodiversidade Brasileira**, v.1, n.1, p.12-19, 2011.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.125, p. 403-410, 1990.

AMOROCHO, D.F; REINA, R.D. Feeding ecology of the East Pacific green sea turtle *Chelonia mydas agassizii* at Gorgona National Park, Colombia. **Endangered Species Research**, v.3, p.43-51, 2007.

ANDERSON, E.T.; HARMS, C.A.; STRINGER, E.M.; CLUSE, W.M. Evaluation of hematology and serum biochemistry of cold-stunned green sea turtles (*Chelonia mydas*) in North Carolina, USA. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.42, n.2, p.247-255, 2011.

ARTHUR, K.E.; BOYLE, M.C.; LIMPUS, C.L. Ontogenetic changes in diet and habitat use in green sea turtle (*Chelonia mydas*) life history. **Marine Ecology Progress Series**, v.362, p.303-311, 2008.

BALAZS, G.H. Current status of fibropapillomas in the Hawaiian green turtle, *Chelonia mydas*. IN: BALAZS, G.H.; POOLEY, S.G. **Research plan for marine turtle fibropapilloma**. Honolulu: U.S Department of Commerce- NOOA Technical Memorandum NMFS-SWFSC-156, 1991. p.47-57.

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

BAPTISTOTTE, C. Fibropapillomatosis in Sea Turtles from South America- Brazil, Uruguay, and Argentina. 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.

BARLEY, A.J.; SPINKS, P.Q.; THOMSON, R.C.; SHAFFER, H.B. Fourteen nuclear genes provide phylogenetic resolution for difficult nodes in the turtle tree of life. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.55, p.1189-1194,2010.

BARNOSKY, A.D.; MATZKE, N.; TOMIYA, S.; WOGAN, G.O.U; SWARTZ, B.; QUENTAL, T.B.; MARSHALL, C.; MCGUIRE. J.L.; LINDSEY, E.L.; MAGUIRE, K.C.; MERSEY, B.; FERRER, E.A. Has the Earth’s sixth mass extinction already arrived? **Nature**. v.471, n.7336, p.51-57, 2011.

BALDASSIN, P; TANIGUCHI, S; GALLO, H; SILVA, R.J; MONTONE, R.C. Persistence organic pollutants in juvenile Magellan penguins (*Spheniscus magellanicus*) found on the northern shore of the state of São Paulo and southern shore of state of Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v.64, p. 2502-2506, 2012.

BARRAGAN. A.R.; SARTI, M.L. A possible case of fibropapilloma in Kemp's Ridley turtle (*Lepidochelys kempii*). **Marine Turtle Newsletter**, v.67, p.27, 1994.

BERUMEN, J.; ORDONEZ, R.M.; LAZCANO, E.; SALMERON, J.; GALVAN, S.C.; ESTRADA, R.A.; YUNES, E.; GARCIA-CARRANCA, A.; GONZALEZ-LIRA, G.; MADRIGAL-CAMPA, A. 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.

BEZERRA, M.F; LACERDA, L.D; LIMA, E.H.S.M; MELO, M.T.D. Monitoring mercury in green sea turtles using keratinized carapace fragments (scutes). **Marine Pollution Bulletin,** 2013.

BJORDNAL, K.A. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. IN: LUTZ, P.L.; MUSICK, J.A. **The biology of sea turtles**. London: CRC Press, 1997, p.199-231, vol I.

BOLTEN, A.B. Variation in sea turtle life history patterns: neritic vs. oceanic development stages. IN: LUTZ, P.L.; MUSICK. J.A.; WYNEKEN.J. **The biology of sea turtles**. Washington, DC: CRC Press, 2003, p.243-257, vol II.

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

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

BRESETTE, M.; FOLEY, A.M.; SINGEWALD, D.A.; SINGEL, K.E.; HERREN, R.M.; REDLOW, A.E. The first report of tumors associated with fibropapillomatosis in Florida. **Marine Turtle Newsletter**, v.101, p.21-23, 2003.

BRITO, F.L.C.; MAIA, F.C.L.; FRANÇA, L.M.O.; ALBUQUERQUE, A.R.; SANTOS, R.A.M.; CAVALCANTI, M.A.M.; GUIMARAES, E.S.G. 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**, v.42, n.12, p. 1330-1334, 2001.

CARR, A.F.; CARR, M.M.; MEYLAN, A.B. The ecology and migrations of sea turtles, 7. The West Caribbean green turtle colony. **Bulletin of American Museum Natural History**, v.162, n.1, p.1-46, 1978.

CATOI, C.; GAL, A.F.; TAULESCU, M.A.; PALMIERI, C.; CATOI, A.F. Lethal herpesviruses in 16 captive horned vipers (*Vipera ammodytes ammodytes*): pathological and ultrastructural findings. **Journal of Comparative Pathology**, v.150, p.341-344,2014.

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

CHALOUPKA, M.; LIMPUS, C.J. Trends in the abundance of sea turtle's resident in southern Great Barrier Reef waters. **Biological Conservation**, v.102, p.235-249, 2001.

CHALOUPKA, M.; LIMPUS, C.; MILLER, J. Green turtle somatic growth dynamics in a spatially disjunct Great Barrier Reef metapopulation. **Coral Reefs**, v.23, p.325-335, 2004.

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

CHAN, E.H. Marine turtles in Malaysia: On the verge of extinction? **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v.9, p.175-184, 2006.

CHAVES, A.; AGUIRRE, A.A.; BLANCO-PEÑA, K.; MOREIRA-SOTO, A.; MONGE, O.; TORRES, A.M.; SOTO-RIVAS, J.L.; LU, Y.; CHACON, D.; FONSECA, L.; JIMENEZ, M.; GUTIERREZ-ESPELETA, G.; LIERZ, M. Examining the role of transmission of *Chelonid Alphaherpesvirus* 5. **EcoHealth**, DOI: 10.1007/s10393-017-1248-7, 2017.

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

CLARK, H.F.; KARZON, D.T. Iguana virus, a herps-like virus isolated from cultured cells of a lizard, *Iguana iguana*. **Infection and Immunity**, v.5, p.559-569, 1972.CLARY, J.C.; LEONG, J.K. Disease studies aid Kemp's ridley sea turtle head start research. **Herpetological Review**, v.15, p.69-70, 1984.

COOPER, J.E.; GSCHMEISSNER, S.; BONE, R.D. Herpes-like virus particles in necrotic stomatitis of tortoises. **The Veterinary Record,** v.123, p.554, 1988.

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.

CRUZ-OCHOA, P.F.; Detection of *Chelonid herpesvirus* 5 (ChHV5) and necropsy findings: preliminary results in lung of *Chelonia mydas* studied in Brazilian Atlantic coast. IN: International Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. **Abstracts…**. Nevada, Las Vegas, 2017.

CUNNINGHAM, A.A.; DASZAK, P. Extinction of a species of land snail due to infection with a microsporidian parasite site. **Conservation Biology**, v.12, p.1139-1141, 1998.

D'AMATO, A.F.; MORAES-NETO, M. First documentation of fibropapillomas verified by histopathology *in Eretmochelys imbricata*. **Marine Turtle Newsletter**, v.89, p.12-13, 2000.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A. Extinction by infection. **Trends in Ecology & Evolution**, v.14, p.279, 1999.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. **Science**, v.287, p.443-449, 2000.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta Tropica**, v.78, p.103-116, 2001.

DAVISON, A.J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G.S.; MCGEOCH, D.J.; MINSON, A.C.; PELLET, P.E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M.J.; THIRY, E. The order Herpesvirales. **Archives of Virology**, v.154, n.1. p.171-177, 2009.

DEEM, S.L.; DIERENFELD, E.S.; SOUNGUET, G.P.; ALLEMAN, A.R.; CRAY, C.; POPPENGA, R.H.; NORTON, T.M.; KARESH, W.B. Blood values in free-ranging nesting leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) on the coast of the Republic of Gabon. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.37, p.464-471, 2006.

DIETZ, R.; ANSEN, C.T.; HAVE, P.; HEIDEJORGENSEN, M.P. Clue to seal epizootic. **Nature**, v.338, p.627, 1989.

DUARTE, A.; FAISCA, P.; LOUREIRO, N.S.; ROSADO, R.; GIL, S.; PEREIRA, N.; TAVARES, L. First histological and virological report of fibropapilloma associated with herpesvirus in *Chelonia mydas* at Príncipe Island, West Africa. **Archives of Virology**, v.157, n.6, p.1155-1159, 2012.

DUCHENE, S.; FREY, A.; ALFARO-NUNEZ, A.; DUTTON, P.H.; GILBERT, M.T.P.; MORIN, P.A. Marine turtle mitogenome phylogenetics and Evolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.65, p.241-150, 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.

ENCALADA, S.E.; LAHANAS, P.N.; BJORNDAL, K.A.; BOLTEN, A.B.; MIYAMOTO, M.M.; BOWEN, B.W. Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. **Molecular Ecology**, v.5, p.473-483, 1996.

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

EPSTEIN, P.R. **Marine ecosystems, emerging diseases as indicators of change: health of the oceans from Labrador to Venezuela**. Boston: The Center for Health and the Global Environment, Harvard Medical School, Oliver Wendell Holmes Society, 1998, 85p.

FLINT, M.; PATTERSON-KANE, J.C.; LIMPUS, C.J.; WORK, T.M.; BLAIR, D.; MILLS, P.C. Post mortem diagnostic investigation of disease in free-ranging marine turtle populations: A review of common pathological findings and protocols. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, p.733-759, 2009.

FLINT, M; MORTON, J.M.; LIMPUS, C.J.; PATTERSON-KANE, J.C.; MURRAY, P.J.; MILLS, P.C. Development and application of biochemical and hematological reference intervals to identify unhealthy green sea turtles (*Chelonia mydas*). **The Veterinary Journal**, v.185, p.299-304, 2010a.

FLINT, M.; BLAIR, D.; PATTERSON-KANE, J.C.; KWAY-TANNER, M.; MILLS, P.C. Blood flukes (Spirorchiidae) as a major cause of marine turtle mortality in Queensland.IN: XII International Congress of Parasitology. 12th, 2010, Melbourne, Australia. **(XII International Congress of Parasitology)**. Australia, 2010b.FLINT, M. Free-Ranging Sea Turtle Health. IN: WYNEKEN, J.; LOHMANN, K.J.; MUSICK, J.A. **The Biology of Sea Turtles**.1. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2013. p.135-163, Vol III.

FONG, C.L.; CHEN, H.C.; CHENG, I.J. Blood profiles from wild populations of green sea turtles in Taiwan. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v.2, n.2, p.8-10, 2010.

GALLO, B.M.G; CAMPANHÃ, R.A.C; CAMPOS, F.P; CHAGAS, C.A; PALUDO, D; GIFFONI, B.B; BECKER, J.H. Levantamento preliminar da ocorrência de tartarugas marinhas nas ilhas do litoral do Estado de São Paulo. IN: Simpósio Brasileiro de Oceanografia, 1., 2002. São Paulo. **Resumos…**, São Paulo: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 2002.

GALLO, B.M.G; MACEDO, S.; GIFFONI, B.B.; BECKER, J.H.; BARATA, P.C.R. Sea Turtle Conservation in Ubatuba, Southeastern Brazil, a Feeding Area with Incidental Capture in Coastal Fisheries. **Chelonian Conservation and Biology**, v.5, n.1, p.93-101, 2006.

GATTAMORTA, M.A. **Ecologia, prevalência e caracterização molecular de *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV) em Tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) em áreas da costa brasileira**, 2015, 122p. Tese (Doutor em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

GILDEN, D.; MAHALINGAM, R.; NAGEL, M.A.; PUGAZHENTHI, S.; COHRS, R.J. The neurobiology of varicela zoster virus infection. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.37, p.441-463, 2011.

GLAZEBROOK, J.S.; CAMPBELL, R.S.F. A survey of diseases of marine turtles in northern Australia I. Farmed turtles. **Disease of Aquatic Organisms**, v.9, p.83-95, 1990.

GODFREY, M.H.; GODLEY, B.J. Seeing past the red: flawed IUCN global listings for sea turtles. **Endangered Species Research**, v.6, p.155-159, 2008.

GORDON, A. N; KELLY, W. R; CRIBB, T.H. Lesions caused by cardiovascular flukes (Digenea: Spirorchidae) in stranded green turtles (*Chelonia mydas*). **Veterinary Pathology**, v.35, p.21-30, 1998.

GOVETT, P.D.; HARMS, C.A.; JOHNSON, A.J.; LATIMER, K.S.; WELLEHAN, J.F.X.; FATZINGER, M.H.; CHRISTIAN, L.S.; KELLY, T.R.; LEWBART, G.A. Lymphoid follicular cloacal inflammation associated with a novel herpesvirus in juvenile alligators (*Alligator mississippiensis*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.474-479, 2005.

GREENBLATT, R.J.; WORK, T.M.; BALAZS, G.H.; SUTTON, C.A.; CASEY, R.N.; CASEY, J.W. The *Ozobranchus* leech is a candidate mechanical vector for the fibropapilloma-associated turtle herpesvirus found latently infecting skin tumors on Hawaiian green turtle (*Chelonia mydas*). **Virology**, v.321, p.101-110, 2004.

GREER, L.L.; STRANDBERG, J.D.; WHITAKER, B.R. *Mycobacterium chelonae* osteoarthritis in a Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys Kempii*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.39, p.736-741, 2003.

GRENFELL, B.T.; DOBSON, A.P. **Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1995. 516p.

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.

HAMANN, M.; SCHAUBLE, C.S.; SIMON, T., EVANS, S. Demographic and health parameters of green sea turtles *Chelonia mydas* foraging in the Gulf of Carpentaria, Australia. **Endangered Species Research**, v.2, p.81-89, 2006.

HAMANN, M.; GODFREY, M.H.; SEMINOFF, J.A.; ARTHUR, K.; BARATA, P.C.R.; BJORNDAL, K.A.; BOLTEN, A.B.; BRODERICK, A.C.; CAMPBELL, L.M.; CARRERAS, C.; CASALE, P.; CHALOUPKA, M.; CHAN, S.K.F.; COYNE, M.S.; CROWDER, L.B.; DIEZ, C.E.; DUTTON , P .H.; EPPERLY, S.P.; FITZSIMMONS, N.N.; FORMIA, A.; GIRONDOT, M.; HAYS, G.C.; CHENG, I.J.; KASKA, Y.; LEWISON, R.; MORTIMER, J.A.; NICHOLS, W.J.; REINA, R.D.; SHANKER, K.; SPOTILA, J.R.; TOMAS, J.; WALLACE, B.P.; WORK, T.M.; ZBINDEN, J.; GODLEY, B.J. Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. **Endangered Species Research**, v.11, p.245-269, 2010.

HARPER, P.A.W.; HAMMOND, D.C.; HEUSCHELE, W.P. A herpesvirus-like agent associated with a pharyngeal abscess in a desert tortoise. **Journal of Wildlife Diseases**, v.18, p.491-494, 1982.

HARSHBARGER, J.C. Sea turtle fibropapilloma cases in the registry of tumors in lower animals. IN: **Research Plan for Marine turtle fibropapilloma: Results of a December 1990 Workshop. NOAA Technical Memorandum**, 1991.

HARVELL, C.D.; KIM, K.; BURKHOLDER, J.; COLDWELL, R.R.; EPSTEIN, P.R.; GRIMES, D.J.; HOFFMAN, E.E.; LIPP, E.K.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; OVERSTREET, R.M.; PORTER, J.; SMITH, G.W.; VASTA, G.R. Emerging marine diseases: Climate links and anthropogenic factors. **Science**, v.285, n.1, p.505-510, 1999.

HASBUN, C.R.; LAWRENCE, A.J.; SAMOUR, J.H.; AL-GHAIS, S.M. Normal blood chemistry of free-living green sea turtles, *Chelonia mydas*, from the United Arab Emirates. **Comparative Haematology International**, v.8, n.3, p.174-177, 1998.

HAUSER, B.; METTLER, F.; RUBEL, A. Herpesvirus-like infection in two young boas. **Journal of Comparative Pathology**, v.93, p.515-519, 1983.

HAYES, R.L; GOREAU, N.I. The significance of emerging diseases in the tropical coral reef ecosystem. **Revista de Biologia Tropical**, v.46, p.173-185, 1998.

HEIDEJORGENSEN, M.P.; HARKNEN, T.; DIETZ, R.; THOMPSON, P.M. Retrospective of the 1988 European seal epizootic. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.13, p.37-62, 1992.

HELDSTAB, A.; BESTETTI, G. Virus associated gastrointestinal diseases in snakes. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.15, p.118-128, 1984.

HELDSTAB, A.; BESTETTI, G. Herpesviridae causing glossitis and meningoencephalitis in land tortoises (*Testudo hermanii*). **Herpetopathologia**, v.1, p.5-9, 1989.

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

HERBST, L.H.; JACOBSON, E.R; MORETTI.; BROWN, T.; SUNBERG, J.P.; KLEIN, P.A. Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.22, p.1-12, 1995.

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

HERBST, L.H.; GREINER, E.C.; EHRHART, L.M.; BAGLEY, D.A.; KLEIN, P.A. Serological association between spirorchidiasis, herpesvirus infection, and

fibropapillomatosis in green turtles from Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, v.34, n.3, p.496-507, 1998.

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

HERBST, L.H.; JACOBSON, E.R. Practical approaches for studying sea turtle health and disease. IN: LUTZ, P.; MUSICK, J.A.; WYNEKEN, J. **The Biology of Sea Turtles**. New York: CRC Press, 2003, p.385-410, vol II.

HIRAMA, S.; EHRHART, L.M.; REA, L.D.; KILTIE, R.A. Relating fibropapilloma tumor severity to blood parameters in green turtles *Chelonia mydas***. Diseases of aquatic organisms**, v.111, p.61-68, 2014.

HIRTH, H.F. Synopsis of the Biological Data on the green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758). **Biological Report**, v.97, n.1, 1997.126p.

HUERTA, P.; PINEDA, H.; AGUTRRE, A.; SPRAKER, T.; SARTI, L.; BARRAGAN, A. First confirmed case of fibropapilloma in a *Leatherback turtle* (*Dermochelys coriacea*). IN: **Proceedings of the 20th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation.** Orlando, Florida, USA: U.S Department of Commerce, National Oceanographic and Atmospheric Administration, 2002, p.193.

ICMBio- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Plano de manejo da estação ecológica Tupinambás e Refúgio da vida silvestre do Arquipélago de Alcatrazes**. Volume 1- Diagnóstico: Brasília, 2017, 160p.

ICTV. **Virus Taxonomy: 2017 Release**. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/.> Acesso em: 01/05/2018.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. 2004. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/details/4615/0.> Acesso em: 01/05/2018.

JACOBSON, E.R. Neoplastic diseases. IN: COOPER, J.E.; JACKSON, O.F. IN: **Diseases of the Reptilia**. London: Academic Press, v.II, 1981, p.429-468.

JACOBSON, E.R. Viruses and viral associated diseases of reptiles. IN: BELS, V.L.; SANDE, A.P.V. **Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia. Maintenance and Reproduction of Reptiles in Captivity**. Belgium: Royal Society of Antwerp, 1986, p.73-89.

JACOBSON, E.R.; MANSELL, J.L.; SUNDBERG, J.P.; HAJJAR, L.; REICHMANN, M.E.; EHRHART, L.M.; WALSH, M.; MURRU, F. Cutaneous fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). **Journal of Comparative Pathology**, v.101, n.1, p.39-52, 1989.

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

JAMES, F.X.; WELLEHAN, J. Clinical Aspects of Evolution in Reptile Medicine. IN: MADER, D.R.; DIVERS, S.J. **Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery**. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2014. p.20-26.

JENSEN, M.P.; FITZSIMMONS, N.N.; DUTTON, P.H. Molecular Genetics of Sea Turtles. IN: WYNEKEN, J.; LOHMANN, K.J.; MUSICK, J.A. **The Biology of Sea Turtles**. 1. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2013. p.135-163, Vol III.

JOHNSON, A.J.; GOVETT, P.D.; WELLEHAN, J.F.X.; C.A. HARMS, T.R. KELLY.; JACOBSON, E.R. Herpesvirus associated with lymphoid follicular cloacal inflammation in a juvenile alligator (*Alligator mississippiensis*). IN: **Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians**. Tucson, AZ. P.89-90, 2005a.

JOHNSON, A.J.; PESSIER, A.P.; WELLEHAN, J.F.X.; BROWN, R.; JACOBSON, E.R. Identification of a novel herpesvirus from a California desert tortoise (*Gopherus agassizii*). **Veterinary Microbiology**, v.111, p.107-116, 2005b.

JONES, K.; ARIEL, E.; BURGUESS, G.; READ, M. A review of fibropapillomatosis in Green turtles (*Chelonia mydas*). **The Veterinary Journal**, v.212, p.48-57, 2016.

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

KAASHOEK, M.J.; STRAVER, P.J.; ROOIJ, V.E.M.A.; QUAK, J.; OIRSCHOT, V.J.T. Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1. 1 strains: Clinical and virological and aspects. **Veterinary Record**, v.139, p.416-421, 1996.

KANG, K.I.; TORRES-VELEZ, F.J.; ZHANG, J.; MOORE, P.A.; MOORE, D.P.; RIVERA, S.; BROWN, C.C. Localization of Fibropapilloma-associated Turtle Herpesvirus in Green Turtles (*Chelonia mydas*) by *In-Situ* Hybridization. **Journal of Comparative Pathology**, v.139, n.4, p.218-225, 2008.

LABRADA-MARTAGÓN, V.; MÉNDEZ-RODRIGUEZ, L.C.; GARDNER, S.C.; LÓPEZ-CASTRO, M.; ZENTENO-SAVIN, T. Health indices of the green turtle (*Chelonia mydas*) along the Pacific coast of Baja California Sur, Mexico. I. Blood biochemistry values. **Chelonian Conservation and Biology**, v.9, n.2, p.162-172, 2010.

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

LAEGREID, W.W.; SKOWRONEK, A.; STONE-MARSCHAT, M.; BURRAGE, T. Characterization of virulence variants of African Horse sickness virus**. Virology**, 195, p.836-839, 1993.

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

LEDERBERG, J.; SHOPE, R.E.; OAKES, S.C.J. **Emerging infections: microbial threats to health in the United States**. Washington, DC: Institute of Medicine, National Academy Press, 1992, 312p.

LEWBART, G.A.; HIRSCHFELD, M.; DENKINGER, J.; VASCO, K.; GUEVARA, N.; GARCIA, J.; MUNOZ, J.; LOHMANN, K.J. Blood Gases, Biochemistry and Hematology of Galapagos Green Turtles (*Chelonia mydas*). **PLOS ONE**, v.9, n.5, 2014.

LIMPUS, C.J.; COUPER, P.J.; COUPER, K.L.D. Crab Island revisited: Reassessment of the world's largest Flatback turtle rookery after twelve years. **Memoirs of the Queensland Museum 33**, p.227-289, 1993.

LIMPUS, C.J.; LIMPUS, D.J. Mangroves in the diet of *Chelonia mydas* in Queensland, Australia. **Marine Turtle Newsletter**, v.89, p.13-15, 2000.

LIMPUS, C.J.; LIMPUS D.J.; ARTHUR, K.E.; PARMENTER, C.J. Monitoring green turtle population dynamics in Shoal water Bay: 2000-2004. IN: **Great Barrier Reef Marine Park Authority and Environmental Protection Agency Queensland Parks and Wildlife Service**, 2005, p.50.

LU, Y.; WANG, Y.; YU, Q.; AGUIRRE, A.A.; BALAZS, G.H.; NERURKAR, V.R.; YANAGIHARA, R. Detection of herpesviral sequences in tissues of green turtles with fibropapilloma by polymerase chain reaction. **Archives of Virology**, v.145, p.1885-1893, 2000.

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

MARCOVALDI, M.A.; BAPTISTOTTE, C.; DE CASTILHOS, J.C.; GALLO, B.M.G.; LIMA, E.H.S.M.; SANCHES, T.M.; VIEITAS, C. Activities by Project TAMAR in Brazilian sea turtle feeding grounds. **Marine Turtle Newsletter**, v.80, p.5, 1998.

MARCOVALDI, M.A.; MARCOVALDI, G.G. Marine turtles of Brazil: the history and structure of Project TAMAR-IBAMA. **Biological Conservation**, v.91, p.35-41, 1999.

MARCOVALDI, M.A.G.; THOMÉ, C.A. Reducción de las amenazas a las tortugas. IN: ECKERT, K.L.; BJORDNAL, K.A.; ABREU-GROBOIS, F.A.; DONNELLY, M. **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas.** Washington: IUCN; SSC Marine Turtle Specialist Group, 2000, p. 187-191.

MARCOVALDI, M.A.A.G.D.; SANTOS, A.S. dos.; SALES, G. Espécies de tartarugas que ocorrem no Brasil. IN**: Plano de Ação Nacional para Conservação das Tartarugas Marinhas. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, 2011a, p. 27-47.

MARCOVALDI, M.A.A.G.D.; SANTOS, A.S. dos.; SALES, G. Ameaças às tartarugas marinhas. IN: **Plano de Ação Nacional para Conservação das Tartarugas Marinhas**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011b, p.48-55.

MARSHANG, R.E. Viruses Infecting Reptiles. **Viruses**, v.3, n.11, p.2087-2126, 2011.

MARQUEZ, M.R. **Fao species catalogue vol 11: sea turtle of the world. an annotated and illustrated catalogue of sea turtle's species known to date**, n.125, v.11, 1990. 81p.

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

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

McARTHUR, S. Infections agents. IN: MCARTHUR, S.; WILKINSON, R.; MEYER, J. **Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2004, p.31-34.

McCOWAN, C.; SHEPHERDLEY, C.; SLOCOMBE, R.F. Herpesvirus-like particles in the skin of a saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*). **Australian Veterinary Journal**, V.82.; p.375-377, 2004.

McGEOCH, D.J.; GATHERER, D. Integrating reptilian herpesviruses into the family Herpesviridae. **Journal of Virology**, v.79, p.725-731, 2005.

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.

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.B.; MEYLAN, P.A. Introducción a la evolución, historias de vida y biologia de las tortugas marinas. IN: ECKERT, K.L.; BJORNDAL, K.A.; ABREU-GROBOIS, F.A.; DONNELLY, M. **Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas**. IUCN/SSC Publicación, 2000, p.3-5.

MONEZI, T. **Identificação de sequências gênicas de *Chelonid Alphaherpesvirus 5* (ChHV5) em tecidos tumorais caracterizados histologicamente e secreções de *Chelonid Alphaherpesvirus 5 (*ChHV5) em tecidos tumorais caracterizados histologicamente e secreções de *Chelonia mydas* capturadas no Litoral Norte do Estado de São Paulo no período de 2001 a 2012**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

MONEZI, T.; MEHNERT, D. U; MOURA, E. M. M.; MÜLLER, N.; GARRAFA, P.; MATUSHIMA, E. R.; WERNECK, M. R.; BORELLA, M. I. *Chelonid herpesvirus* 5 in secretions and tumor tissues from green turtles (*Chelonia mydas*) from Southeastern Brazil: A ten-year study. **Veterinary Microbiology**, v. 186, p. 150-156, 2016.

MONROE, J.H.; SHIBLEY, G.P.; SCHIDLOVSKY, T.; NAKAI, T.; HOWATSON, A.F.; WIVEL, N.W.; O'CONNOR, T.E. Action of snake venom on Rauscher virus., **Journal of the National Cancer Institute**, v.40, p.135-145, 1968.

MORRISON, C.L.; IWANOWICZ, L.; WORK, T.M.; FAHSBENDER, E.; BREITBART, M.; ADAMS, C.; IWANOWICZ, D.; SANDERS, L.; ACKERMANN, M.; CORNMAN, R.S. Genomic Evolution, recombination, and inter-strain diversity of *Chelonid alphaherpesvirus* 5 from Florida and Hawaii green sea turtles with fibropapillomatosis. **PeerJ**, DOI 10.7717/peerj.4386, 2018.

MORTIMER, J. Feeding ecology of sea turtles. IN: BJORNDAL K.A. **Biology and conservation of sea turtles**. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1982, p.103-109, vol I.

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

NARO-MACIEL, E.; LE, M.; FITZSIMMONS, N.N.; AMATO, G. Evolutionary relationships of marine turtles: A molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.49, p.659-662, 2008.

NARO-MACIEL, E.; BONDIOLI, A.C.V.; MARTIN, M.; ALMEIDA, A.P.; BAPTISTOTTE, C.; BELLINI, C.; MARCOVALDI, M.A.; SANTOS, A.J.B.; AMATO, G. The interplay of homing and dispersal in green turtles: A focus on the Southwestern Atlantic. **Journal of Heredity**, vol.103, n.6, p. 792-805, 2012.

NG, T.F.F.; MANIRE, C.; BORROWMAN, K.; LANGER, T.; EHRKART, L.; BREITBART, M. Discovery of a novel single-stranded DNA virus from a sea turtle fibropapilloma by using viral metagenomics. **Journal of Virology**, v.83, p.25000-2509, 2009.

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

O'TOOLE, D.; LI, H. The pathology of malignant catarrhal fever, with emphasis on Ovine herpesvirus 2. **Veterinary Pathology**, v.51, n.2, p. 437-452, 2014.

OTTONI-NETO, G.F.; GALLO, B.M.G.; BECKER, J.H. Ocorrência de Tartarugas marinhas na ESEC Tupinambás. IN: **Relatório técnico para elaboração do plano de manejo da ESEC Tupinambás**, 2002.

OBENDORF, D.L.; CARSON, J.; MCMANUS, T.J. *Vibrio damsela* infection in a stranded leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.23, p.666-668, 1987.

ORAVETZ, C.A. Reducción de la captura incidental en pesquerías. IN: ECKERT, K.L.; BJORDNAL, K.A.; ABREU-GROBOIS, F.A.; DONNELLY, M. **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas.** Washington: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group, 2000, p.217-221.

OROS, J.; ARENCIBIA, A.; FERNANDEZ, L.; JENSEN, H.E. Intestinal candidiasis in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*): An immunohistochemical study. **Veterinary Journal**, v.167, p.202-207, 2004.

OSBORNE, A.G.; JACOBSON, E.R.; BRESETTE, M.J.; SINGEWALD, D.A.; SCARPINO, R.A.; BOLTEN, A.B. Reference intervals and relationships between health status, carapace length, body mass, and water temperature and concentrations of plasma total protein and protein electrophoretogram fractions in Atlantic loggerhead sea turtles and green turtles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.237, n.5, p.561-567, 2010.

PAGE-KARJIAN, A.; TORRES, F.; ZHANG, J.; RIVERA, S.; DIEZ, C.; MOORE, P.A.; MOORE, D.; BROWN, C. Presence of chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus in tumored and non-tumored green turtles, as detected by polymerase chain reaction, in endemic and non-endemic aggregations, Puerto Rico. **SpringerPlus**, v.1, p.35, 2012.

PAGE-KARJIAN, A.; NORTON, T.M.; RITCHIE, B.; BROWN, C.; MANCIA, C.; JACKWOOD, M.; GOTTDENKER, N.L. Quantifying *Chelonid herpesvirus* 5 in symptomatic and asymptomatic rehabilitating green sea turtles. **Endangered Species Research**. v.28, p. 135-146, 2015.

PAGE-KARJIAN, A.; GOTTDENKER, N.L.; WHITFIELD, J.; HERBST, L.; NORTON, T.M.; RITCHIE, B. Potential Non-Cutaneous sites of *Chelonid Herpesvirus* 5 Persistence and shedding in green sea turtles (*Chelonia mydas*). **Journal of Aquatic Animal Health**, DOI: 10.1080/08997659.2017.1321590, 2017.

PATRICIO A.R.; HERBST, L.H.; DUARTE, A.; VELES-ZUAZO, X.; LOUREIRO, N.S. PEREIRA, N.; TAVARES, L.; TORANZOS, G.A. Global phylogeographic and evolution of chelonid fibropapilloma- associated herpesvirus. **The Journal of General Virology**, v. 93, p.1035, 2012.

PORTER, J.W.; LEWIS. S.K.; PORTER, K.G. The effect of multiple stressors on the Florida Keys coral reef ecosystem: a landscape hypothesis and a physiological test. **Limnology and Oceanography**, v.44, p.941-949, 1999.

PRITCHARD, P.C.H. Evolution, phylogeny and current status. IN: LUTZ, P.H.; MUSICK, J.A. **The Biology of Sea Turtles**. 1 ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1996. p. 1-28.

PRITCHARD, P.C.H.; MORTIMER, J.A. Taxonomy, External Morphology, and Species Identification. IN: Eckert, K.L.; BJORDNAL, F.A.; ABREU-GROBOIS, M.P**. Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles.** Ed. Washington: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication, n.4, 1999.

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

RAYNAUD, M.M.A.; ADRIAN, M. Lesion cutanees a structure papillomateuse associees a des virus chez las lizard vert (*Lacerta viridis* Laur). **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.283, p.845-847, 1976.

REBELL, G.; RYWLIN, A.; HAINES, H. A herpesvirus agent associated with skin lesions of green sea turtles in aquaculture. **Journal of Veterinary Research**, v.36, p.1221-1224, 1975.

RODENBUSCH, C.R.; ALMEIDA, L.L.; MARKS, F.S; ATAÍDE, M.W; ALIEVI, M.M; TAVARES, M; PEREIRA, R.A; CANAL, C.W. Detection and characterization of fibropapilloma associated herpesvirus of marine turtles in Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.11, p.1179-1183, 2012.

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

ROIZMAN, B; SEARS, A.E. Herpes simplex viruses and their replication. IN: **Fields Virology**, 3 ed., v.2, p.2231-2298, 1996.

ROSENTHAL, K.L; MADER, D.R. Bacterial diseases. IN: MADER, D.M. **Reptile medicine and surgery**, 2 ed. Missouri: Elsevier, 2006. P.227-238.

ROSSI, S. **Análise da atividade de leucócitos e de bifenilas policloradas aplicada ao estudo da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) (Linnaeus 1758).** 2014, 168p. Tese (Doutor em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

ROSSI, S.; SANCHEZ-SARMIENTO, A.M.; VANSTREELS, R.E.T.; SANTOS, R.G. dos; PRIOSTE, F.E.S; GATTAMORTA, M.A; GRISI-FILHO, J.H.H.; MATUSHIMA, E.R. 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**, V.11, N.12, 2016.

SAMOUR, J.H.; HEWLETT, J.C.; SILVANOSE, C.; HASBÚN, C.R.; ALPGHAIS, S.M. Normal haematology of free-living green sea turtles (*Chelonia mydas*) from the United Arab Emirates. **Comparative Haematology International**, v.8, n.2, p.102-107, 1998.

SANCHEZ-SARMIENTO, A. M; ROSSI, S; VILCA, F.Z; VANSTREELS, R.E.T; MONTEIRO, S.H; VALE, L.A.S; SANTOS dos, R.G; MARIGO, J; BERTOZZI, C.P; GRISI-FILHO, J.H.H; TORNISIELO, V.L; MATUSHIMA, E.R. Organochlorine pesticides in green sea turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomatosis caught at three feeding areas off Brazil. **Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom**, p.1-9, 2016.

SANTOS, M.R.D.dos; FERREIRA, L.S.; BAPTISTOTTE, C.; GROSSMAN, A.; BELLINI, C. Valores hematológicos de tartarugas marinhas *Chelonia mydas* (Linaeus, 1978) juvenis selvagens do Arquipélago Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.46, n.6, p.491-499, 2009.

SANTOS, M.R.D.dos; MARTINS, A.S.; BAPTISTOTTE, C.; WORK, T.M. Health condition of juvenile *Chelonia mydas* related to fibropapillomatosis in southeast Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.115, p.193-201, 2015.

SANTOS, R.G.dos; MARTINS, A.S.; TOREZANI, E.; BAPTISTOTTE, C.; FARIAS, J.N.; HORTA, P.A.; WORK, T.M.; BALAZS, G.H. Relationship between fibropapillomatosis and environmental quality: a case study with *Chelonia mydas* of Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.89, p.87-95,2010.

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

SILVA, M.A; JERDY, H.L; RIBEIRO, R.B; MEDINA, R.M; PETRONILHA, M.B.R.G; SHIMODA, E; WERNECK, M.R; ANDRADE, J.G; CARVALHO, E.C.Q. Histopathological findings in lungs of hawksbill turtles collected on the coasts of the states of Espírito Santo and Rio de Janeiro, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., v.68, n.5, p.1267-1274, 2016.

SILVA, C.C; VARELA Jr, A.S; BARCAROLLI, I.F; BIANCHINI, A. Concentrations and distributions of metals in tissues of stranded green sea turtles (*Chelonia mydas*) from the southern Atlantic coast of Brazil. **Science of Total Environment**, p.109-118, 2014.

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

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

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.

STAMPER, M.A.; HARMS, C.; EPPERLY, S.P.; BRAUN-MCNEILL, J.; STOSKOPF, M.K. Relationship between barnacle epibiotic load and hematologic parameters in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*), a comparison between migratory and residential animals in Pamlico Sound, North Carolina. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.36, p.635-641, 2005.

STRAUSS, J.H.; STRAUSS, E.G. **Viruses and Human Diseases**. 2 ed. Oxford, UK: Elsevier, 2008. 476p.

TAGLIOLATTO, A.B.; GUIMARAES, S.M.; LOBO-HAJDU.; MONTEIRO-NETO, C. Characterization of fibropapillomatosis in green turtles *Chelonia mydas* (Cheloniidae) captured in a foraging area in southeastern Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.121, p.233-240, 2016.

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

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.

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

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

VILCA, F.Z; ROSSI, S; OLINDA, R.A; SANCHEZ-SARMIENTO, A.M; PRIOSTE, F.E.S; MATUSHIMA, E.R; TORNISIELO, V.L. Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in liver samples of juvenile green sea turtles from Brazil: Can these compounds play a role in the development of fibropapillomatosis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 130, p.215-222, 2018.

WATSON, G.L. Herpesvirus in red-heads (common) agamas (*Agama agama*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.444-445, 1993.

WELLEHAN J.F.X.; JARCHOW, J.L.; REGGIARDO, C.; JACOBSON, E.R. A novel herpesvirus associated with hepatic necrosis in a San Esteban chuckwalla (*Sauromalus varius*). **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, v.13, p.15-19, 2003.

WELLEHAN J.F.X.; NICHOLS, D.K.; LI, L.L.; KAPUR, V. Three novel herpesviruses associated with stomatitis in Sudan plated lizards (*Gerrbosaurus major*) and a black-lined plated lizard (*Gerrbosaurus nigrolineatus*)**. Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.35, p.50-55, 2004.

WELLEHAN, J.F.X.; JOHNSON, A.J.; LATIMER, K.S.; WHITEDISE, D.P.; CRAWSHAW, G.J.; DETRISAC, C.J.; TERRELL, S.P.; HEARD, D.J.; CHILDRESS, A.; JACOBSON, E.R. Varanid herpesvirus-1: a novel herpesvirus associated with proliferative stomatitis in green tree monitors (*Varanus prasinus*). **Veterinary Microbiology**, v.105, p.83-92, 2005.

WERNECK, M.R; SILVA, R.J. Helminth Parasite of Juvenile Green Turtles *Chelonia mydas* (Testudines: Cheloniidae) in Brazil. **Journal of Parasitology**, v.101, n.6, p.713-716, 2015.

WHITING, S.D.; GUINEA, M.L.; LIMPUS, C.J.; FOMIATTI, K. Blood chemistry reference values for two ecologically distinct population of foraging green turtles, eastern Indian Ocean. **Comparative Clinical Pathology**, v.16, p.109-118, 2007.

WHITTINGTON, R.J.; JONES, J.B.; HINE, P.M.; HYATT, A.D. Epizootic mortality in the pilchard *Sardinops sagax neopilchardus* in Australia and New Zealand in 1995. I. Pathology and epizootiology. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.28, p.1-16, 2007.

WILLIAMS, E.H.; BUNKLEY-WILLIAMS, L.; PETERS, E.C.; PINTO-RODRIQUEZ, B.; MATOS-MORALES, R.; MIGNUCCI-GIANNONI, A.A.; HALL, K.; RUEDA-ALMONACID, J.V.; SYBESMA, J.; DECALVENTI, I.B.; BOULON, R.R. Na epizootic of cutaneous fibropapillomas in green turtles *Chelonia mydas* of the Caribbean: Part of panzootic? **Journal of Aquatic Animal Health**, v.6, p.70-78, 1994.

WORK, T.M. Marine Turtle Fibropapillomatosis Infection Etiology. 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.5.

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

WORK, T.M.; BALAZS, G.H.; RAMEYER, R.A.; MORRIS, R.A. Retrospective pathology survey of green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis in the Hawaiian Islands, 1993-2003**. Diseases of Aquatic Organisms**, v.6, p.163-176, 2004.

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

WORK, T.M.; DAGENAIS, J.; BALAZS, G.H.; SCHETTLE, N.; ACKERMANN, M. Dynamics of virus shedding and In Situ confirmation of Chelonid Herpesvirus 5 in Hawaiian green turtles with fibropapillomatosis. **Veterinary Pathology**, DOI: 10.1177/0300985814560236, 2014.

WORK, T.M.; DAGENAIS, J.; WEATHERBY, T.M.; BALAZ, G.H.; ACKERMANN, M. *In vitro* replication of Chelonid Herpesvirus 5 in organotypic skin cultures from Hawaiian Green turtles (*Chelonia mydas*). **Journal of Virology**, v. 91: e00404_17 DOI 10.1128/JVI.00404-17, 2017.

WYNEKEN, J. The Anatomy of Sea Turtles. IN: **Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470**, p.1-172, 2001.

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.

ZHANG, L.; MARRIOTT, K.A.; HARNISH, D.G.; ARONSON, J.F. Reassortant analysis of guinea pig virulence of pichinde virus variants. **Virology**, v.290, p.30-38, 2001.

ZWARG, T; ROSSI, S; SANCHES, T.C; CESAR, M.O.C; WERNECK, M.R; MATUSHIMA, E.R. Hematological and histopathological evaluation of wildlife green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapilloma from the north coast of Sao Paulo State, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.7, 2014.