

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

“OCORRÊNCIA DO CHELONID ALPHAHERPESVIRUS 5 (chhv-5) EM
AMOSTRAS SANGUÍNEAS DE TARTARUGAS-VERDES (*Chelonia mydas*)
DE CINCO ESTADOS BRASILEIROS”

ISABEL RANGEL PRADO FERREIRA

Botucatu

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

“OCORRÊNCIA DO CHELONID ALPHAHERPESVIRUS 5 (ChHV-5) EM
AMOSTRAS SANGUÍNEAS DE TARTARUGAS-VERDES (*Chelonia mydas*)
DE CINCO ESTADOS BRASILEIROS”

ISABEL RANGEL PRADO FERREIRA

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Hidalgo Friciello Teixeira

Coorientadora: Prof. Assoc. Ligia Souza Lima Silveira da Mota

Botucatu

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Ferreira, Isabel Rangel Prado.

Ocorrência do Chelonid alphaherpesvirus 5 (ChHV-5) em amostras sanguíneas de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) de cinco estados brasileiros / Isabel Rangel Prado Ferreira. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Rodrigo Hidalgo Friciello Teixeira

Coorientador: Lígia Souza Lima Silveira da Mota

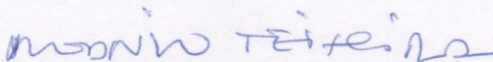
Capes: 20406010

1. Tartaruga-marinha. 2. Sangue. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Tumores.

Palavras-chave: Chelonid alphaherpesvirus; Neoplasia; PCR; Sangue; Tartarugas marinhas.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ISABEL RANGEL PRADO FERREIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANIMAIS SELVAGENS, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 10 dias do mês de novembro do ano de 2023, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ISABEL RANGEL PRADO FERREIRA, intitulada **OCORRÊNCIA DO CHELONID ALPHAHERPES VIRUS 5 (ChHV-5) EM AMOSTRAS SANGUÍNEAS DE TARTARUGAS-VERDES (*Chelonia mydas*) DE CINCO ESTADOS BRASILEIROS**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. RODRIGO HIDALGO FRICIELLO TEIXEIRA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Zoológico de Sorocaba, Prof. Dr. FELIPE FORNAZARI (Participação Virtual) do(a) Depto de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / FMVZ - UNESP, Profa. Ass. ELIANA REIKO MATUSHIMA (Participação Virtual) do(a) Depto de Patologia / FMVZ - USP. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. RODRIGO HIDALGO FRICIELLO TEIXEIRA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Prof. Lígia por ter me acolhido desde o primeiro dia que pisei no Lab. Sem o seu apoio, esse trabalho não seria possível. Tenho uma grande admiração profissional e pessoal por você, a Sra. é inspiração para vida! Muito obrigada pelo voto de confiança, pela paciência e por todos ensinamentos e conselhos!

Aos meus pais Fernando e Paula e meus irmãos Dedei e Dadão! Vocês são minha base e meu porto seguro. Obrigada por sempre me apoiarem nas minhas “aventuras”.

Aos meus amigos e colegas Larissa e Pedro, obrigada por estarem ao meu lado desde o princípio. Vocês me ensinaram, apoiaram e acolheram de uma forma inexplicável. Sou muito grata por tudo que fizeram por mim!

Aos queridos Mateus, João, Catharina e Laura vocês transformaram dias difíceis em dias alegres e divertidos. Obrigada por toda ajuda com este trabalho mas principalmente, obrigada por toda parceria!

Ao Prof. Rodrigo Teixeira, obrigada por acreditar no meu potencial desde o primeiro momento!

À minha maior fonte de luz nos últimos tempos e amiga que levarei pro resto da vida, Mari. Ter você no dia-a-dia é um presente! Compartilhar a vida, o lar e o Banguela com você, foi das maiores alegrias da vida!

À República Saideira, lar que me acolheu desde que cheguei em Botucatu há 9 anos e foi parte essencial do meu crescimento para me tornar a pessoa que sou hoje. Meu carinho por vocês é infinito!

À Comeu, Duhuki e Rebenta, presentes que a Veterinária me trouxe e que eu levo pra vida!

À minha “bff” Maithê, que eu morro de saudade e que mesmo estando longe, nunca deixou de estar comigo em todos altos e baixos na vida!

Ao Projeto Caminho Marinho, que abriu os caminhos para que eu pudesse seguir meus objetivos profissionais, possibilitando que esta pesquisa acontecesse. Sem vocês, nada disso seria possível. Agradeço muito pela oportunidade.

Ao Projeto Chelonia mydas e a Camila Miguel, tenho muita admiração pelo seu trabalho. Muito obrigada pela parceria, ensinamentos e oportunidade de conhecer pessoas e lugares incríveis!

Ao Projeto Aruanã, obrigada pela parceria e toda contribuição com esta pesquisa! Agradeço pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional com vocês!

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP Botucatu, onde realizei o sonho de criança de me tornar Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

PRADO-FERREIRA, I. R. Ocorrência do Chelonid alphaherpesvirus 5 (ChHV 5) em amostras sanguíneas de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) de cinco estados brasileiros. Botucatu, 2023. 78p. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (FMVZ – UNESP).

RESUMO

A fibropapilomatose (FP) é uma enfermidade neoplásica de caráter benigno e ocorrência circuntropical que afeta tartarugas marinhas em todos os oceanos. A doença tem alta relevância no meio científico, por ser considerada uma notável ameaça a sobrevivência destes animais, principalmente da tartaruga-verde (*Chelonia mydas*). Estudos moleculares têm detectado a presença do Chelonid alphaherpesvirus 5 associado a tecidos tumorais, sugerindo o ChHV 5 como agente etiológico da fibropapilomatose, embora exista um consenso na literatura de que a FP tem caráter multifatorial. A presença do ChHV 5 em ambientes marinhos contaminados por ação antrópica, associada a resposta do sistema imune individual e genética de cada organismo, são fatores que desempenham papel importante na manifestação dos tumores e evolução da doença. Particularidades envolvendo infecção e disseminação do ChHV 5 em tartarugas marinhas ainda não foram elucidados. Porém, testes moleculares de amplificação gênica por reação em cadeia polimerase (PCR) demonstraram a ocorrência do Chelonid alphaherpesvirus 5 não somente em neoformações cutâneas, como também em pele, sangue, secreções e órgãos parenquimatosos ou intra-cavitários de tartarugas marinhas com tumores característicos da FP e aparentemente saudáveis, sugerindo infecções subclínicas ou latentes. Desta maneira, supõe-se que tartarugas marinhas sintomáticas e assintomáticas, possam atuar como reservatórios do vírus. O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência do ChHV 5 em amostras sanguíneas de tartarugas verdes (*C. mydas*) juvenis de vida livre acometidas ou não pela FP, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os animais envolvidos neste estudo foram capturados em diferentes regiões costeiras abrangendo cinco

estados brasileiros: BA, ES, RJ, SC e RS. No total, 157 tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas* foram capturadas, e 43 apresentavam tumores cutâneos característicos de FP, indicando uma prevalência geral da doença de 27% (43/157). Individualmente a prevalência da FP entre os animais capturados foi de 8,8% (4/45) na Bahia, 53,3% (24/45) no Espírito Santo, 35% (7/20) no Rio de Janeiro, 35,7% (5/14) em Santa Catarina e 9% (3/33) no Rio Grande do Sul. Todos os animais tiveram amostras sanguíneas coletadas, dados biométricos registrados e passaram por exame físico geral. Em tartarugas marinhas que apresentavam tumores cutâneos, foram registrados quantidade, local e tamanho dos mesmos. Para investigar a presença do DNA viral nas amostras sanguíneas coletadas por meio da técnica de PCR foram utilizados os conjuntos de *primers* UL-18 e UL-30, que possuem diferentes genes alvos e tamanhos (pb). UL-18 que tem como gene-alvo a proteína do capsídeo do ChHV 5 detectou o vírus em 13/157 amostras sanguíneas. Em contrapartida não foram detectadas sequências do gene da DNA polimerase, referente ao *primer* UL-30, em nenhuma das amostras sanguíneas analisadas. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o conjunto de *primers* UL-18 foi mais sensível para detecção do ChHV 5. E que, apesar da presença do vírus no sangue não ter sido abundante, foi demonstrada a circulação do ChHV 5 na corrente sanguínea de animais juvenis de vida livre com tumores sugestivos de FP e assintomáticos, evidenciando disseminação hematológica do patógeno.

Palavras-chave: Tartarugas marinhas. Sangue. PCR. Herpesvirus. Neoplasia.

PRADO-FERREIRA, I. R. Detection of ChHV 5 on bloodstream of wild caught green sea turtles (*Chelonia mydas*) off the coast of Brazil. Botucatu, 2023. 78p. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (FMVZ – UNESP).

ABSTRACT

Fibropapillomatosis is a neoplastic disease that affects sea turtles worldwide in panzootic proportions. FP has circumtropical distribution and is characterized by a single or multiple cutaneous growths with occasional appearance in visceral organs. FP is a major concern to the scientific community, as it is considered a serious threat to the survival of sea turtles. Although tumors are histologically benign, depending on their size, location and degree of invasiveness, they can often cause affected animals to become debilitated. Tumours may compromise natural behaviour by hampering feeding, vision, swimming ability and in case of visceral tumors, leading to organ failure or physiological imbalances. Fibropapillomatosis has been reported in all sea turtle species, but it mainly affects green turtles (*Chelonia mydas*). Most evidence points to a herpesviral etiology for FP, with the majority of molecular data suggesting that Chelonid alphaherpesvirus 5 (ChHV 5) is the main causative agent of the disease. Even though FP pathogenesis is not yet fully elucidated, it is known that multiple factors play a role in tumour development and disease progression, including ChHV 5 infection as well as, environmental and immune-related cofactors. Several studies have detected the presence of ChHV 5 through molecular technologies such as polymerase chain reaction (PCR) not only in epithelial cells of FP tumours but also in skin, blood, secretions and organs of tumoured and nontumoured sea, suggesting latent and subclinical. Thus, symptomatic and asymptomatic sea turtles may be considered ChHV 5 reservoirs and serve as potential source of viral transmission. Thereby, this study aimed to investigate the occurrence of ChHV 5 on blood samples of juvenile wild caught tumoured and nontumoured green sea turtles through PCR. The specimens were captured along five states off the

coast of Brazil: Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A total of 157 *Chelonia mydas* were captured and 43 of them had FP-like tumours, indicating a prevalence of 27% (43/157). All sea turtles went through physical examination and biometry was registered. 157 blood samples were collected for molecular analysis. On FP-afflicted turtles tumour count, location and size were registered. ChHV 5 was detected on 13/157 DNA extracts of blood samples by standard PCR essays, using primer set UL-18 that bind to ChHV 5 capsid protein gene. On the other hand, primer set UL-30 that bind to ChHV 5 DNA polymerase gene, did not detect the presence of the virus in any blood samples. The results indicate that detection sensitivity for primer set UL-18 is superior. Even though virus detection on blood samples were not abundant, the circulation of ChHV 5 on bloodstream of symptomatic and asymptomatic juvenile wild caught green sea turtles was demonstrated, confirming hematogenous dissemination.

Keywords: Sea turtle. Blood. PCR. Chelonid alphaherpesvirus 5. Neoplasia. Virus.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APA – Área de Proteção Ambiental

ChHV 5 – Chelonid alphaherpesvirus 5

cm – Centímetros

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

FP – Fibropapilomatose

ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*

Kg – Quilogramas

m – Metro

mm – Milímetro

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

μL – Microlitro

ng – Nanograma

pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RNA – Ácido ribonucleico

qPCR – PCR quantitativo em tempo real

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

TAE – Tampão contendo TRIS, ácido acético e EDTA

UC – Unidade de Conservação

UV – Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características para identificação de <i>Chelonia mydas</i>	15
Figura 2: Distribuição das placas em carapaça, plastrão e cabeça de <i>Chelonia mydas</i>	16
Figura 3: Mapa de localização dos pontos de capturas intencionais.....	35
Figura 4: Rede de emalhe Projeto Caminho Marinho nos Molhes da Barra da Praia do Cassino, Rio Grande (RS) para captura intencional de tartarugas verdes (<i>C. mydas</i>) juvenis de vida livre.....	37
Figura 1: Rede de emalhe Projeto Chelonia mydas no estuário do Rio Piraqueaçu, Aracruz (ES) para captura intencional de tartarugas-verdes (<i>C.mydas</i>) de vida livre.....	39
Figura 6: Captura de tartaruga-verde (<i>C. mydas</i>) de vida livre com tarrafa na Ilha de Coroa Vermelha, Nova Viçosa (BA).....	40
Figura 7: Rede de arrasto-de-praia Projeto Aruanã para captura intencional de tartarugas verdes (<i>C. mydas</i>) de vida livre na praia de Itaipu, Niterói (RJ).....	42
Figura 8: Coleta sanguínea por punção do seio venoso cervical em indivíduo <i>C. mydas</i>	43
Figura 9: Massa tumoral em região cervical em <i>C. mydas</i>	47
Figura 10: Tumores em olho esquerdo; região inguinal e cloaca e nadadeiras anteriores em <i>C.mydas</i>	48
Figura 11: Tumores em região cervical e nadadeira em <i>C. mydas</i>	48
Figura 12: Tumores em nadadeira anterior, região axilar e plastrão em <i>C. mydas</i>	49
Figura 13: Massa tumoral de grande dimensão em nadadeira e tumores em região cervical em <i>C. mydas</i>	49
Figura 14: Biometria de comprimento curvilíneo de carapaça (CCC) com fita métrica em indivíduo <i>C. mydas</i>	50
Figura 15: Biometria de largura curvilíneo de carapaça (LCC) com fita métrica em indivíduo <i>C. mydas</i>	51
Figura 16: Pesagem de indivíduo <i>C. mydas</i> utilizando balança digital para determinar massa corpórea (MC).....	51

Figura 17: Quantificação e mensuração de tumores característicos de FP em indivíduo *C.mydas*.....52

Figura 18: Amostras sanguíneas: produtos de PCR amplificados no fragmento do gene da proteína de capsídeo do ChHV 5 (140 pb) em gel de agarose 1,5%.....54

Figura 19: Teste de sensibilidade: amostras A – H diluídas a partir do C+ para determinar sensibilidade do primer UL-18 (140 pb) na detecção do ChHV 5...55

Figura 20: Teste de sensibilidade: amostras A – H diluídas a partir do C+ para determinar sensibilidade do primer UL-30 (445 pb) na detecção do ChHV 5...55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de tartarugas marinhas que ocorrem no Brasil e grau de ameaça de extinção de acordo com IUCN e ICMBio/MMA.....	20
Tabela 2: Conjunto de <i>primers</i> e as respectivas sequências de nucleotídeos, tamanho do fragmento e referências bibliográficas.....	42
Tabela 3: Avaliação da sensibilidade dos conjuntos de <i>primers</i> da detecção do DNA viral em diferentes diluições	43
Tabela 4: Relação entre n° de animais capturados e presença ou ausência de tumores (FP) de acordo com local de origem	45
Tabela 5: Relação entre índice de fibropapilomatose (FPI), escore de severidade (FPS) e origem dos animais	51
Tabela 6: Relação entre n° de animais com e sem FP detectados positivos pela PCR utilizando conjunto de primers UL-18, de acordo com local de origem	53
Tabela 7: Relação entre n° de animais capturados em cada região e prevalência da FP	58
Tabela 8: Relação entre número de amostras de sangue coletadas em cada área de estudo, detecção do ChHV 5 por meio da PCR de acordo com os conjuntos de primers UL-18 e UL-30, presença ou ausência de tumores sugestivos de FP e grau de severidade (FPS) da doença.....	62

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1.1 TARTARUGAS MARINHAS	14
1.2 TARTARUGA VERDE (<i>Chelonia mydas</i>)	15
1.3 TARTARUGAS MARINHAS COMO BIOMARCADORES DA SAÚDE DO ECOSSISTEMA MARINHO	18
1.4 AMEAÇAS ÀS TARTARUGAS MARINHAS	19
1.5 FIBROPAPILOMATOSE.....	21
1.5.1 CARACTERIZAÇÃO	21
1.5.2 HISTÓRICO	22
1.5.3 ETIOLOGIA.....	23
1.5.4 CARÁTER MULTIFATORIAL.....	25
1.5.5 CURSO CLÍNICO.....	26
1.5.6 PATOGENIA DO ChHV 5	26
2. OBJETIVO	33
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 ÁREAS DE ESTUDO E CAPTURA INTENCIONAL	34
3.2 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS E DADOS BIOMÉTRICOS	40
3.3 ANÁLISES MOLECULARES	41
3.3.1 Extração de DNA	41
3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	41
3.3.3 Teste de sensibilidade dos <i>primers</i>	42
3.3.4 Análise dos produtos de PCR	43
3.3.5 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos.....	43

4. RESULTADOS	45
4.1 TARTARUGAS MARINHAS CAPTURADAS	45
4.1.1 Amostras biológicas e ocorrência de tumores de FP	45
4.1.2 Dados biométricos e escore de fibropapilomatose	48
4.2 ANÁLISES MOLECULARES	53
4.3 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	56
5. DISCUSSÃO	58
5.1 DADOS BIOMÉTRICOS E PREVALÊNCIA DA FP	58
5.2 TESTES MOLECULARES E DETECÇÃO DO ChHV 5	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
7. REFERÊNCIAS	67

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 TARTARUGAS MARINHAS

As tartarugas marinhas são répteis da ordem Testudines, subordem Cryptodira, que surgiram no planeta Terra há mais de 100 milhões de anos, tendo sobrevivido às mais variadas mudanças geológicas e climáticas. São caracterizadas por uma estrutura corpórea formada por uma carapaça de formato hidrodinâmico, resultado da fusão dos ossos das vértebras e costelas. Os quelônios, que incluem tartarugas marinhas, terrestres e de água doce, são considerados animais extremamente resistentes, já que sofreram poucas alterações em seu processo evolutivo até os dias atuais (ERNEST, 1989; LUTCAVAGE, 1997; LUTZ, 1997; WYNEKEN, 2001).

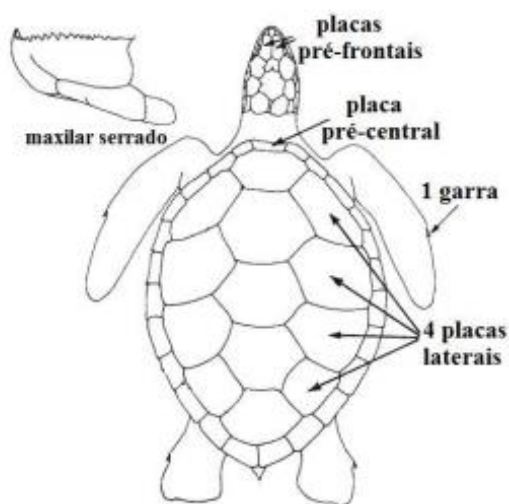
Atualmente, existem 7 espécies de tartarugas marinhas no mundo, sendo seis pertencentes a família *Cheloniidae*, que apresentam carapaça coberta por placas de queratina, e apenas um exemplar da família *Dermochelyidae*, que possui pele semelhante a couro. Dentre estas espécies, cinco utilizam a costa brasileira como área de alimentação e/ou reprodução: tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), tartaruga-oliva (*Lepidochelys olivacea*), tartaruga-de-pente (*Eretmochelys imbricata*), tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*) e tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriacea*) (TAMAR, 2023).

Todas as espécies têm em comum um ciclo de vida com alternância de habitats de alimentação e reprodução ao longo da vida. Por isso, se tratam de animais cosmopolitas e altamente migratórios (MUSICK, 1997). Durante diferentes épocas do ano, tanto o litoral quanto as ilhas oceânicas brasileiras servem como importantes áreas de alimentação e reprodução para *C. mydas*, *C. caretta*, *L. olivacea*, *E. imbricata* e *D. coriacea* (TAMAR, 2023).

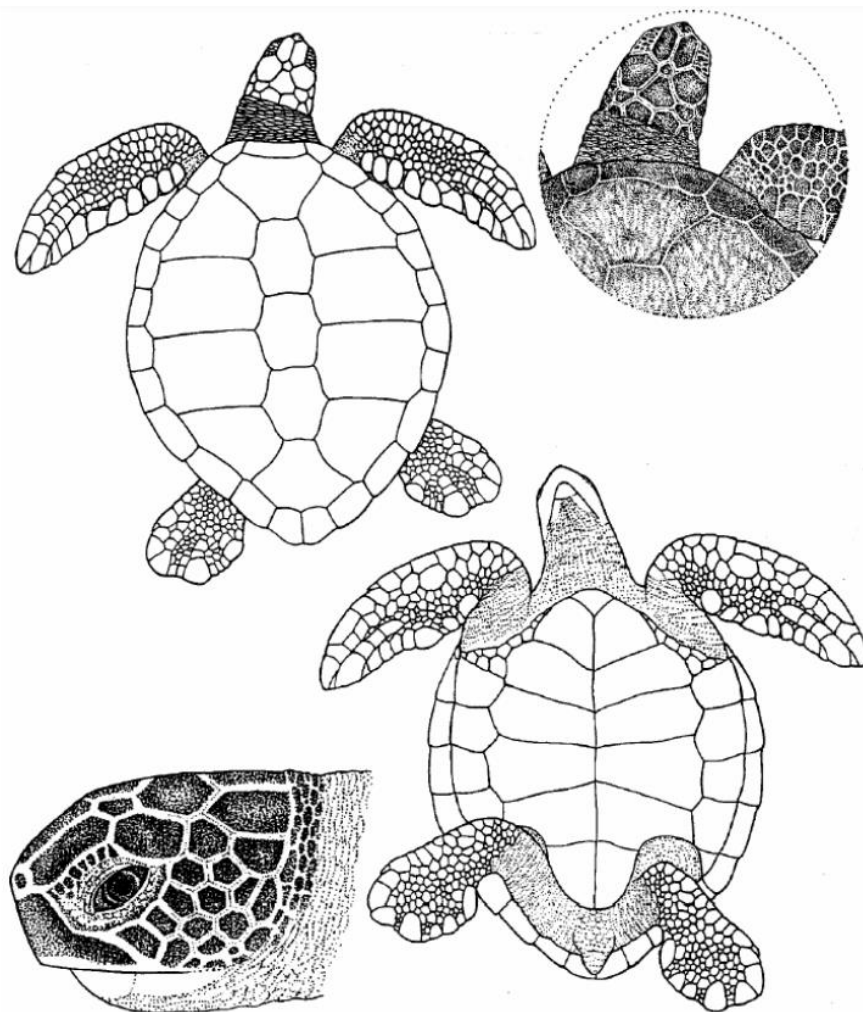
1.2 TARTARUGA VERDE (*Chelonia mydas*)

A espécie *Chelonia mydas*, popularmente conhecida como tartaruga verde, foi primeiramente descrita por Linnaeus em 1758 como *Testudo mydas* (FORMIA, 2002). Tartarugas verdes, assim chamadas devido a tonalidade esverdeada de sua gordura, pertencem a família *Cheloniidae* e consequentemente apresentam carapaça óssea revestida por placas de queratina. Em *C. mydas*, estas placas são justapostas e possuem uma coloração que varia entre tons de verde e marrom, podendo apresentar manchas ou padrões rajados e estriados (FORMIA, 2002). A cabeça tem formato arredondado e a mandíbula é revestida por estrutura cornea e serrilhada denominada ranfoteca. Apresentam plastrão branco ou amarelo claro, pele em tom acinzentado e porção ventral das nadadeiras em tons amarelados (WYNEKEN, 2001). Para identificação da espécie analisa-se a presença de quatro pares de placas laterais justapostos na carapaça, dois pares de placas pré-frontais e quatro pares de placas pós-orbitais na cabeça (PRITCHARD, MORTIMER, 2000).

Figura 2: Características para identificação *Chelonia mydas*



Fonte: Adaptado FAO (1990)

Figura 3: Distribuição das escamas em carapaça, plastrão e cabeça de *Chelonia mydas*

Fonte: Pritchard e Mortimer (2000)

C. mydas possui distribuição global, sendo encontrada em oceanos tropicais, sub-tropicais e temperados. Trata-se da espécie que possui hábitos mais costeiros, sendo encontradas inclusive, em estuários de lagos e rios e ao redor de ilhas oceânicas (HIRTH, 1997). No Brasil, as desovas de tartarugas verdes ocorrem principalmente nas ilhas oceânicas Atol das Rocas (RN), Ilha de Trindade (ES) e Fernando de Noronha (PE). Na costa, áreas de desova secundárias ocorrem na Bahia, Espírito Santo, Rio Grande de Norte e Sergipe (MUSICK, 1997).

A eclosão dos ovos de tartarugas marinhas ocorre simultaneamente, um comportamento denominado facilitação social (CARR, HIRTH, 1961), em que a escavação do ninho ocorre em cadeia. Assim, cada filhote estimula a

escavação de outro, facilitando o alcance à superfície. Deste modo, a maioria dos filhotes emerge na praia ao mesmo tempo, diminuindo a suscetibilidade a diversos predadores (FORMIA, 2002). Durante o percurso até o mar, características químicas e físicas da praia natal são registradas por estes filhotes, fenômeno conhecido como *imprinting*. Acredita-se que estes fatores sejam responsáveis pelo retorno destes animais, anos mais tarde, como adultos em idade reprodutiva, às praias próximas ao local de seu nascimento para acasalar e desovar (LOHMANN *et al.*, 1997), comportamento conhecido como filopatria natal (CARR *et al.*, 1978). Após a eclosão dos ovos nas praias, os filhotes deslocam-se para o mar, iniciando um complexo e longo ciclo de vida.

Determinar onde as tartarugas marinhas estão durante seus primeiros anos de vida tem sido um obstáculo para a compreensão da ecologia destes animais. Na literatura, estes primeiros anos da vida são denominados “anos perdidos”, justamente pela falta de informação sobre o que ocorre naturalmente neste período (PUTMAN, 2013; CARR, *et al.*, 1978). Os filhotes recém-eclodidos realizam uma deriva passiva ocasionada pelas correntes marítimas, permanecendo em ambiente pelágico por um tempo antes de começarem o deslocamento para áreas mais costeiras (MEYLAN, MEYLAN, 2000).

Na fase inicial de vida, a tartaruga verde apresenta hábitos onívoros, adotando gradualmente preferência por hábitos herbívoros, conforme aproxima-se da fase juvenil (BJORNDAL, 1997). Na fase juvenil, deslocam-se até as áreas de alimentação ou “habitats de desenvolvimento”. Estas áreas são caracterizadas pela abundância de plantas aquáticas e algas, preferência alimentar das tartarugas verdes, sendo geralmente representadas por regiões costeiras (MORTIMER, 1982; SPOTILA, 2004).

Os indivíduos juvenis podem permanecer em uma única área de alimentação ou então migrar entre elas e lá, se mantêm por longos períodos durante seu ciclo de vida, onde se desenvolvem até se tornarem sexualmente maduros (ECKERT, 2004), entre seus 25 e 50 anos (CHALOUPEKA *et al.*, 2004). As fêmeas adultas, tendo atingido a maturidade sexual, iniciam então a migração em direção ao local de seu nascimento. Ao longo do período de migração, que pode somar milhares de quilômetros (ALMEIDA, 2011), elas se

reproduzem com diversos machos, até finalmente chegarem às praias onde realizam a(s) desova(s).

Desse modo, ocorre periodicamente a migração de indivíduos adultos sexualmente maduros entre ambientes pelágicos, baías neríticas e praias de nidificação. O senso de direção tão aprimorado que permite o retorno de uma tartaruga marinha ao mesmo local, tanto tempo depois de seu nascimento, se deve não somente ao fenômeno de *imprinting*, mas também ao campo magnético da Terra, que exerce grande influência sobre espécies migratórias (LOHMANN et al., 2001).

1.3 TARTARUGAS MARINHAS COMO BIOMARCADORES DA SAÚDE DO ECOSSISTEMA MARINHO

As tartarugas marinhas são consideradas excelentes biomarcadores da saúde do ecossistema marinho pois desempenham papel ecológico fundamental no equilíbrio do mesmo. Primeiramente, devido ao fato destes animais servirem como substrato para diferentes espécies marinhas que se fixam a sua carapaça, tornando-se morada para epibiontes, garantindo a dispersão e sobrevivência de tais organismos (BJORNDAL, JACKSON, 2003). Cracas, algas e outros epibiontes fixados ao casco das tartarugas irão por sua vez, fornecer alimento para outros animais, como peixes e camarões (FRICK et al., 2004; DELLINGER et al., 1997).

Tartarugas marinhas fêmeas sexualmente maduras são responsáveis pela transferência de nutrientes entre os ambientes marinhos e terrestres (AGUIRRE, 2004). Por se tratarem de animais migratórios, que necessitam percorrer extensos trajetos saindo de áreas de alimentação até as praias de nidificação em áreas costeiras, são capazes de realizar a reciclagem de nutrientes nas áreas de forrageamento, por meio do consumo de alimento e excreção de resíduos (BJORNDAL, BOUCHARD, 2000). A energia e nutrientes armazenados pelos animais vindos da área de alimentação são transferidos para as praias em forma de ovos. Apenas parte da energia volta aos oceanos carregada pelos filhotes. O restante irá permanecer nos ecossistemas terrestres, seja no solo, vegetação ou diretamente para a fauna local (TAMAR, 2023).

Tartarugas marinhas estão presentes em diferentes níveis da cadeia trófica, atuando como presas, consumidoras e competidoras de outras espécies, em diferentes etapas do seu ciclo de vida (MUSICK, LIMPUS, 1997). Devido a diversificada preferência alimentar de cada uma das espécies, estes animais podem ser considerados responsáveis pelo controle de diversas populações de seres vivos do ambiente marinho, tais como esponjas, algas, águas-vivas, peixes e crustáceos que estão inclusas em suas variadas dietas (BJORNDAL, 1997). Além disso, durante todas as suas fases de vida, tartarugas marinhas servem de alimento para predadores em ambientes terrestres ou marinhos, seja por meio do consumo de ovos e filhotes recém-nascidos nas praias de desova ou indivíduos filhotes, juvenis e até adultos nos oceanos.

Por fim, por se tratarem de vertebrados marinhos com longa expectativa de vida e respiração pulmonar, ocupam a interface ar-água, sofrendo ao impacto de contaminantes ambientais, tanto na sua alimentação marinha como na inspiração de voláteis tóxicos (AGUIRRE, LUTZ, 2004), tornando-as vulneráveis à degradação antropogênica do ambiente.

1.4 AMEAÇAS ÀS TARTARUGAS MARINHAS

Apesar de estarem habitando naturalmente os oceanos há milhões de anos, a sobrevivência das tartarugas marinhas vem sendo ameaçada devido a constante interferência do ser humano no ecossistema marinho nos últimos séculos (WYNEKEN et al., 2002).

Segundo critérios do Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de extinção do Ministério do Meio Ambiente (ICMBio/MMA, 2022) e da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2023), todas as espécies de tartarugas marinhas que existem mundialmente, encontram-se em algum grau de risco de extinção.

Tabela 1: Espécies de tartarugas marinhas que ocorrem no Brasil e grau de ameaça de extinção de acordo com IUCN (2023) e ICMBio/MMA (2022)

ESPÉCIE	IUCN	ICMBio/MMA
<i>Chelonia mydas</i>	EN	NT
<i>Caretta caretta</i>	VU	VU
<i>Lepidochelys olivacea</i>	VU	VU
<i>Eretmochelys imbricata</i>	CR	EN
<i>Dermochelys coriacea</i>	VU	CR
NT = quase ameaçada (near threatened)		
VU = vulnerável (vulnerable)		
EN = em perigo (endangered)		
CR = criticamente em perigo (critically endangered)		

As ameaças a estas espécies são observadas ao longo de toda a costa brasileira, variando em cada região. É fato que as atividades humanas são o principal motivo da drástica queda populacional de tartarugas marinhas que vem ocorrendo nos últimos séculos (BJORNDAL, JACKSON, 2003). Ações antrópicas diretas ou indiretas, tais como a interação com a pesca, captura incidental, colisão com embarcações, poluição dos oceanos, exploração de recursos naturais, presença de contaminantes na água, ocupação desordenada de pessoas e trânsito de veículos em praias de desovas, alterações climáticas, caça para consumo de carne e comercialização de carapaça, entre outros, levam ao encalhe e morte de inúmeros animais diariamente ao redor do globo (BJORNDAL, 1995; HERBST, 1995; BUGONI, 2001; LUTZ, 2002; MARCOVALDI et al., 2011).

Nesse contexto, devido ao impacto gerado pelas ações antrópicas no ecossistema marinho, processos envolvendo predação, parasitismo e enfermidades que ocorrem naturalmente, acabam por também comprometer a conservação das tartarugas marinhas, se tornando ameaças a sobrevivência destes animais (GALLO, 2006). Isto porque, mesmo ocorrendo de forma natural, contribuem em menor escala, para a diminuição das populações de tartarugas marinhas que já se encontram drasticamente reduzidas.

Alguns patógenos causadores ou associados a enfermidades que já levaram a morte de tartarugas marinhas já descritos em literatura científica incluem: parasitas *Spirorchidae* e *Caryospora cheloniae* (FLINT et al., 2010), bactérias como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Fusobacterium*, *Salmonella*,

Clostridium, *Flavobacterium* e *Mycobacterium* (CLARY; LEONG, 1984; OBENDORF; CARSON; McMANUS, 1987; GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990; GREER; STRANDBERG; WHITAKER, 2003; McARTHUR, 2004; FICHI et al., 2016), fungos como: *Candida*, *Aspergillus*, *Colletotrichum acutatum*, *Penicillium lilacinum*, *Sporotrichum*, *Cladosporium*, *Paecilomyces* e *Fusarium* (OROS et al., 2004; FLINT et al., 2009), enfatizando alguns agentes com potencial zoonótico incluindo *Mycobacterium spp.*, *Vibrio spp.*, *Salmonella spp.* e *Campylobacter spp.* (GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990).

Epstein (1998) e Harvell et al. (1999) relataram que no período de seus estudos, a ocorrência de doenças em ambientes marinhos vinha aumentando em decorrência de atividades antrópicas. A fibropapilomatose (FP), descrita pela primeira vez em 1936, vem se disseminando em proporções assustadoras, acometendo tartarugas marinhas em todos os oceanos nos dias atuais, sendo considerada uma doença panzoótica emergente (HERBST, 1994; WILLIAMS, et al., 1994; AGUIRRE et al., 1999).

1.5 FIBROPAPILOMATOSE

A fibropapilomatose (FP) é uma enfermidade neoplásica de ocorrência circuntropical que afeta tartarugas marinhas em todos os oceanos (BAPTISTOTTE, 2007). A doença apresenta alta relevância no meio científico, por ser considerada uma notável ameaça a sobrevivência destes animais. A FP é uma neoplasia de caráter benigno caracterizada por formações fibroepiteliais cutâneas e eventuais fibromas internos em órgãos (KANG et al., 2008).

1.5.1 CARACTERIZAÇÃO

Apesar de seu curso benigno, a fibropapilomatose é uma doença debilitante e potencialmente fatal (AGUIRRE, 1998), já que os tumores podem vir a dificultar condições fisiológicas e prejudicar funções orgânicas, ameaçando a sobrevivência destes animais no meio natural (HERBST, 1994; LUTZ, 2003). Dependendo da localização anatômica, os tumores podem comprometer a hidrodinâmica e dificultar comportamentos naturais como a locomoção, respiração, visão e alimentação dos animais. Já os tumores

internos, podem prejudicar funções orgânicas tais como a digestão, respiração, função cardíaca e até mesmo a flutuabilidade (BALAZS, 1986; QUACKENBUSCH et al., 1998; LUTZ, 2003).

Fibropapilomas cutâneos são caracterizados por simples ou múltiplos tumores, de tamanhos bastante variáveis. Possuem aspecto verrucoso ou liso, podendo ser sesséis ou pedunculados. Podem ainda ser pigmentados ou não, a depender da pigmentação da pele no local de crescimento do tumor (HERBST, 1994; RODENBUSCH, 2012). São encontrados principalmente em nadadeiras, região inguinal e axilar, base da cauda, pescoço e cabeça, especialmente nos olhos (HERBST, 1994; BAPTISTOTTE, 2007; ROSSI, 2007).

Nódulos viscerais já foram descritos em necropsias de animais apresentando tumores cutâneos. Estes tumores são caracterizados como fibromas, fibrossarcomas e mixofibromas, sendo encontrados majoritariamente em pulmões, coração, fígado, rins e trato gastrointestinal (WILLIAMS et al., 1994; AGUIRRE, et al. 2001; NORTON et al., 1990; WORK, BALAZS, 1998; QUACKENBUSCH, et al., 2001). Considerando-se a possibilidade de etiologia infecciosa da doença, especula-se que os tumores internos sejam consequência de septicemia (BALAZS, 1997; JACOBSON et al., 1991; NORTON et al., 1990; WORK et al., 2004).

O diagnóstico da doença se dá por meio da observação de tumores característicos e posterior confirmação por exame histopatológico. Histologicamente são caracterizados por projeção papilar e hiperplasia de epiderme, proliferação de fibroblastos, presença de feixes de fibra de colágeno na derme e corpúsculos de inclusão (MATUSHIMA, 2003; GREENBLATT et al., 2005).

1.5.2 HISTÓRICO

A FP foi descrita pela primeira vez em uma tartaruga-verde (*C. mydas*) no Aquário de Nova Iorque, em 1936. O animal havia sido trazido da Flórida alguns anos antes de manifestar os tumores (SMITH, COATES, 1938). A partir da primeira notificação, casos vem sendo registrados com crescente frequência nos Estados Unidos. (HERBST, 1994; BALAZS, 1991; CHALOUPKA et al.,

2005; ENE et al., 2005; FOLEY et al., 2005; GREENBLATT et al., 2005; PAGE-KARJIAN et al., 2012; PAGE-KARJIAN et al., 2015; ALFARO-NÚÑEZ et al., 2014; ALFARO-NÚÑEZ et al 2016; CHAVES et al., 2017).

No Brasil, a fibropapilomatose foi registrada pela primeira vez em 1986 no Espírito Santo, também em *Chelonia mydas* (BAPTISTOTTE, 2001). De forma similar ao que ocorreu nos Estados Unidos, novos casos da doença começaram a ser registrados ao longo da costa brasileira desde então. A prevalência de FP notificada nos estados brasileiros entre os anos 2000 e 2014, de acordo com dados do estudo de Baptistotte (2016), foi de 32,59% no Ceará (n=2940), 26,06% na Paraíba (n=278), 22,66% na Bahia (n=7176), 21,18% no Rio Grande do Norte (n=779), 21,06% no Espírito Santo (n=5124), 20,20% no Rio de Janeiro (n=5390), 14,91% em Alagoas (n=1330), 13,92% em Sergipe (n=819), 10,43% em São Paulo (n=11366), 4,21% em Santa Catarina (n=831), 0,41% em Pernambuco (n=245), 0,14% no Atol das Rocas (RN) (n=720) e 0,04% no Rio Grande do Sul (n=2431).

Já foram reportados casos de FP em todas as espécies de tartarugas marinhas ao redor do mundo sendo descrita na literatura como uma doença panzoótica emergente (HERBT, 1994; WILLIAMS, et al., 1994; AGUIRRE et al., 1999; ROSSI et al., 2015). A tartaruga verde (*Chelonia mydas*) é a espécie mais acometida pela fibropapilomatose. Apesar de não existirem dados concretos sobre a razão da alta prevalência da doença em *C. mydas*, especula-se que esteja associada aos seus hábitos mais costeiros quando comparados às outras espécies, já que permanecem longos períodos se alimentando de algas em regiões próximas a costa contaminadas por ação antrópica (WORK, 2005). Por este motivo, a doença é também conhecida como Green Turtle Fibropapillomatosis (GTFP).

1.5.3 ETIOLOGIA

Apesar da etiologia da doença ainda não estar completamente esclarecida até os dias atuais, evidências levaram a hipótese de que a FP fosse causada por um agente infeccioso viral, devido sua natureza epizootica associada ao súbito aparecimento de casos em novas localizações (HERBST et al., 1995; LACKOVICH et al., 1999; QUACKENBUSCH et al., 1998).

Herbst et al. (1995), já demonstravam a existência de um vírus envelopado na etiologia da FP. Jacobson et al. (1991) identificaram a presença de partículas associadas a tumores, por meio das microscopias óptica e eletrônica, sugerindo infecção por herpesvirus em tartarugas marinhas com FP em ambiente natural. Desde 1998, sequências curtas do DNA do vírus associado a fibropapilomatose vêm sendo descritas e depositadas no *Genbank* (National Center for Biotechnology Information), possibilitando estudos envolvendo o genoma viral (QUACKENBUSH et al., 1998, 2001; LU et al, 2000; ENE et al., 2005; GREENBLATT et al., 2005; HERBST et al., 2004, 2008; STACY et al., 2008; WORK et al., 2009).

A partir de então, testes de amplificação gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) têm detectado consistentemente a presença do Chelonid alphaherpesvirus 5 associado aos tecidos tumorais de tartarugas marinhas de diferentes espécies em variadas regiões, sugerindo o ChHV 5 como agente etiológico primário para a enfermidade (LACKOVICH et al., 1999; LU et al., 2000; QUACKENBUSCH et al., 2001; HERBST et al., 2004; ENE et al., 2005; DUARTE et al., 2012; PAGE-KARJIAN et al., 2012; RODENBUSCH, 2012; ALFARO-NUÑEZ et al., 2014; MONEZI, 2016; ZAMANA, 2018; SANTOS, 2019; ROBBEN, 2023). Em 2005, a análise de uma sequência de 23.055 pares de bases do genoma do herpesvirus associado a fibropapilomatose, realizada por Greenblatt et al., revelou que o vírus pertence a família *Herpesviridae*.

No Brasil, foram realizados exames moleculares, histopatológicos, ultra-estruturais e imuno-histoquímicos em amostras de tecidos tumorais, além de análises moleculares, bioquímicas e de perfil hematológico em amostras sanguíneas de tartarugas marinhas, afim de esclarecer a etiologia da FP e do vírus em questão (MATUSHIMA et al., 1999, 2001, 2003, 2005; MONEZI, 2012; ZWARG et al., 2014). Também foram realizados diversos trabalhos envolvendo a detecção e caracterização do ChHV 5 (MEHNERT et al., 2001; MONEZI et al., 2006; RODENBUSCH, 2012; GATTAMORTA, 2016; MONEZI et al., 2016; ZAMANA 2018; SANTOS, 2019; ZAMANA, 2023).

1.5.4 CARÁTER MULTIFATORIAL

Embora estudos moleculares apontem o ChHV 5 como agente etiológico da doença, há um consenso na literatura científica de que a FP tem caráter multifatorial, estando associada a fatores ambientais e possivelmente genéticos, e não somente a um agente infeccioso (QUACKENBUSH, 1998; AGUIRRE, LUTZ, 2004). Ambientes marinhos antropizados, caracterizados principalmente por áreas costeiras contaminadas por ação humana relacionadas ao crescimento demográfico desordenado, desenvolvimento de atividades industriais e agrícolas, escoamento de esgoto, entre outros, afetam diretamente a saúde dos animais marinhos (BALAZS, 1991; HERBST, 1995; GREENBLATT, 2005; FORMIA, 2007; VAN HOUTAN et al., 2010).

No caso das tartarugas marinhas, acredita-se que poluentes afetem diretamente sua condição imunológica, contribuindo para a manifestação clínica e evolução da doença (BALAZS, 1991; HERBST, 1995). Alguns autores sugerem uma correlação entre FP e o tempo de exposição dos animais aos contaminantes no desenvolvimento de tumores (ADNYANA et al., 1997; CHALOUPIKA, BALAZS, 2005).

Fatores ambientais envolvendo variações de temperatura, profundidade, correntes marítimas, luminosidade, pH podem interferir na persistência de partículas virais no ambiente (CURRY et al., 2000) e, evidências sugerem que alterações ambientais causadas por ação antrópica são responsáveis por conferir potencial oncogênico ao ChHV 5 (FOLEY et al., 2005; VAN HOUTAN et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2010; JONES et al., 2016).

A associação entre elevadas prevalências de FP e a degradação do ambiente marinho por atividades antropogênicas em áreas costeiras foi demonstrada em diversos estudos (BALAZS, 1991; ADNYANA et al., 1997; FOLEY et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2010; VAN HOUTAN et al., 2010) porém ainda não está bem esclarecida. No entanto, o monitoramento da FP em tartarugas marinhas serve como um indicador de saúde do ecossistema marinho (AGUIRRE, LUTZ, 2004). Hamman et al. (2010), citaram a fibropapilomatose na lista de prioridades para estudos na área da conservação.

1.5.5 CURSO CLÍNICO

Clinicamente, tartarugas marinhas acometidas pela fibropapilomatose podem apresentar-se debilitadas principalmente devido a imunodepressão e caquexia, gerados por um conjunto de fatores envolvendo os tumores: incapacidade de alimentação e locomoção, alta demanda energética em função do crescimento de tumores, estresse crônico, efeitos das células inflamatórias mediadas pelo sistema imunológico e susceptibilidade exacerbada à infecções secundárias e patógenos oportunistas (HERBST, 1994; WORK et al., 2003; STACY et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2010).

Testes hematológicos realizados em tartarugas verdes acometidas pela FP, demonstraram hipoproteinemia, diminuição no número de linfócitos, eosinófilos e basófilos e aumento de heterófilos e monócitos (CRAY et al., 2001; NORTON et al., 1990; FLINT et al., 2010a; ZWARG et al., 2014). A heterofilia e linfopenia estão associadas ao estresse e imunossupressão e a monocitose à inflamação crônica.

Há registros da doença em tartarugas marinhas nos estágios de vida juvenil, sub-adulto e adulto, não tendo sido descrita em filhotes (HERBST, 1994). A classe etária das tartarugas verdes (*C. mydas*), de acordo com Wyneken (2003), é determinada de acordo com a medida do comprimento curvilíneo de carapaça (CCC). Sendo consideradas juvenis quando $CCC < 65\text{cm}$, subadultos quando $65\text{cm} < CCC < 90\text{ cm}$ e adultas $CCC > 90\text{ cm}$.

A frequência da FP é maior em indivíduos *C. mydas* juvenis e sub-adultos em comparação aos adultos. Elevadas prevalências da FP em indivíduos juvenis com CCC entre 30 e 80 cm foi observada nos Estados Unidos, Austrália, Indonésia e Brasil (ADNYANA et al., 1997; LIMPUS, MILLER, 1990; FOLEY et al., 2005; BAPTISTOTTE, 2007).

1.5.6 PATOGENIA DO ChHV 5

O Chelonid alphaherpesvirus 5 (ChHV 5) pertence ao gênero *Scutavirus*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, família *Herpesviridae* e ordem *Herpesvirales*, de acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2023). Este vírus apresenta indícios de coevolução com os quelônios. ChHV 5

parece ter surgido antes da divisão de alphaherpesvirus de mamíferos e aves, sugerindo que sejam exclusivos de tartarugas marinhas (HERBST et al., 2004; McGEACH, GATHERER, 2005; DAVISON et al., 2009). Herpesvirus são esféricos e possuem um fita dupla de DNA linear, englobado por um capsídeo de simetria icosaédrica, envolto por uma matriz proteica denominada tegumento e por um envelope lipídico com proteínas de membranas associadas à sua superfície (STRAUSS, 2006; DAVISON et al., 2009).

De forma generalizada, os herpesvirus apresentam estrutura complexa e são capazes de estabelecer infecções latentes em seus hospedeiros naturais, podendo persistir durante toda a vida. A infecção latente é estabelecida em células não-permissivas ou semi-permissivas ao desenvolvimento do vírus, geralmente em tecido nervoso. Durante o ciclo lítico em que ocorre a replicação viral no organismo do hospedeiro, um grupo diferente de células, geralmente epiteliais, é infectado e assim são liberadas partículas virais capazes de infectar outros indivíduos (STRAUSS, 2006; GATTAMORTA, 2016).

A infecção latente pode ser reativada naturalmente quando o hospedeiro é submetido a estresse crônico e há o comprometimento de seu sistema imunológico, seja por fatores ambientais ou genéticos, provocando a quebra da latência (STRAUSS, 2006; NATHANSON, 2007; GATTAMORTA, 2016). No momento em que é reativado, o patógeno pode manifestar-se clinicamente no próprio hospedeiro ou infectar novos indivíduos. A latência permite oportunidades de propagação do vírus na natureza (STRAUSS, 2006).

Em geral, a transmissão dos herpesvirus ocorre horizontalmente de um organismo infectado para outro por contato direto via saliva, secreções, aerossóis, células infectadas, fezes/urina e sangue (STRAUSS, 2006; GATTAMORTA, 2016; JONES et al., 2020). O tecido de eleição do ChHV 5 aparenta ser a pele e acredita-se que a transmissão ocorra primariamente por meio da descamação de células da epiderme de tartarugas marinhas infectadas pelo vírus no ambiente (HERBST et al., 1995, 1999; WORK et al., 2014).

Devido ao mecanismo de latência, tartarugas marinhas infectadas pelo vírus, ainda que sejam assintomáticas, podem atuar como reservatórios do ChHV 5. É válido ressaltar que mesmo na ausência de formações cutâneas, o

vírus pode se disseminar (STRAUSS, STRAUSS, 2006; DERUELLE, FAVOREEL, 2011). Evidências apontam que a transmissão do ChHV 5 em tartarugas marinhas ocorra principalmente nas áreas de alimentação, onde há aglomeração de um grande número de animais e possibilidade de contato entre indivíduos e variantes regionais do herpesvirus comuns aos animais de cada uma destas áreas (QUACKENBUSCH et al., 1998; ENE et al., 2005; HERBST et al., 2004; RODENBUSCH, 2012; GATTAMORTA, 2016).

Embora o mecanismo de latência de alguns alphaherpesvirus seja bem descrito na literatura, não é o caso do ChHV 5. A atividade lítica do patógeno foi demonstrada *in vitro* por Work et al., (2017), por meio da formação de corpúsculos de inclusão intranucleares em cultura organotípica de pele. Porém, as tentativas de isolamento do vírus *in vitro* não obtiveram sucesso (WORK et al., 2009). Nestes casos, o sequenciamento genômico é uma alternativa para auxiliar na compreensão de enfermidades como a FP.

Diversos tipos de genoma de herpesvirus são conhecidos e sua organização pode variar dependendo do número, posição e direção das sequências. De uma maneira geral, o genoma dos herpesvirus é dividido em duas regiões: uma sequência longa única (UL) e uma sequência curta única (US), acompanhadas por sequências de repetições (FAUQUET, et al., 2005; PELLET, ROIZMAN, 2007). Desde 1998, sequências curtas do DNA do Chelonid alphaherpesvirus 5 vem sendo descritas e depositadas no *Genbank*, possibilitando estudos envolvendo o genoma do vírus (QUACKENBUSH et al., 1998, 2001; LU et al., 2000; ENE et al., 2005; GREENBLATT et al., 2005; HERBST et al., 2004, 2008; STACY et al., 2008; WORK et al., 2009).

Em 2004, Herbst et al. descreveram pela primeira vez a organização parcial do genoma do ChHV 5 em uma sequência de 43.843 pb. A região descrita, que compreende a região longa única entre UL9 e UL30, inclui 20 genes que são ortólogos aos genes de outros alphaherpesvirus e é organizada de forma similar. Também foi descrito um novo segmento entre as regiões UL15 e UL18, que não é equivalente a nenhum outro herpesvirus descrito. Somente em 2012, Ackermann et al. sequenciaram o genoma completo do ChHV 5, descrevendo sua organização. De acordo com este estudo, a sequência completa do genoma do ChHV 5 compreende um total de 132.233

pb, organizados em uma sequência longa única (UL), uma sequência curta única (US) e sequências repetidas invertidas (IRs).

Pesquisas recentes tem ampliado o conhecimento envolvendo sequências de nucleotídeos e variantes do ChHV 5. A análise da sequência de fragmentos do gene da DNA polimerase do vírus tem se mostrado um importante meio de identificação de variantes de alphaherpesvirus. Morrison et al. (2018) por meio de análise *multi-loci*, demonstraram que há diferenças consideráveis entre cepas virais de acordo com a localização geográfica.

Herbst et al. (2004) identificaram cinco variantes, Flórida A, B, C, D e Havaiana (HA) em tartarugas de diferentes espécies, a partir da comparação entre 6.801 pb do genoma viral de alphaherpesvirus isolados de fibropapilomas. Ene et al. (2005) detectaram infecção pelas variantes A e B em um mesmo indivíduo da espécie *Chelonia mydas*.

Greenblatt et al. (2005), a partir de análise da glicoproteína B, descreveram quatro grupos em variantes do Atlântico e Pacífico: o Atlântico (envolvendo sequências da Flórida e Barbados), Pacífico Médio (Havaí), Pacífico Oeste (Austrália) e Pacífico Leste (Califórnia e Costa Rica). Em 2008, Stacy et al., propuseram o novo gênero *Chelonivirus* na subfamília *Alphaherviridae* baseada nas sequências da DNA polimerase viral detectadas por meio da PCR em tartarugas marinhas. Em estudo desenvolvido por Patricio et al., (2012), foram detectadas quatro linhagens geográficas do ChHV 5, por meio da análise de sequências parciais de genes do herpesvirus, em diferentes espécies de tartarugas marinhas (*C. mydas*, *C. caretta* L. *kempii* e *L. olivacea*). Após análises filogenéticas, foram descritos quatro grupos filogeográficos: Leste do Pacífico (Califórnia, Costa Rica e México), Atlântico Oeste/Leste do Caribe (Flórida e Barbados), Atlântico (Golfo da Guiné e Porto Rico), meio-Oeste do Pacífico (Austrália e Havaí).

No Brasil, Rodenbusch et al., (2014) identificaram seis sequências parciais da DNA polimerase viral que foram disponibilizadas no banco de dados *GenBank*. A análise filogenética identificou as variantes 1 e 2 (SP), variante 3 (ES), variante 4 (SP, ES, BA) como semelhantes ao grupo Atlântico e as variantes 5 (BA) e 6 (CE) semelhantes ao grupo Pacífico. Em 2016, Gattamorta, descreveu uma nova variante que apresentava 100% de semelhança com as sequências identificadas por Patricio (2012) em Porto Rico

e Golfo da Guiné, sugerindo que o vírus pode circular entre diferentes regiões. Um trabalho desenvolvido por Alfaro-Núñez et al., (2014) descreveu diferenças entre alphaherpesvirus detectados em amostras de cinco espécies de tartarugas marinhas distribuídas globalmente.

Testes de amplificação gênica por meio da técnica de PCR já detectaram o ChHV 5 em pele (LU et al., 2000; QUACKENBUSH et al., 2001; PAGE-KARJIAN et al., 2012; ALFARO-NÚÑEZ et al., 2014; RODENBUSCH, 2012; GATTAMORTA, 2016; CHAVES et al., 2017; ZAMANA, 2018; SILVA, 2019; LOGANATHAN et al., 2021; ROBBEN, 2023; ZAMANA, 2023), pulmões, coração, rins, baço, fígado, vesícula biliar, ovários, testículos, língua, cérebro e tireoides (LU et al., 2000; ZAMANA, 2018; SILVA, 2019), secreções oculares, orais e cloacais, sangue, urina e plasma (GATTAMORTA, 2016; MONEZI et al., 2016; PAGE-KARJIAN et al., 2015, SILVA, 2019) de tartarugas verdes acometidas pela FP.

Além disso, estudos recentes revelaram a presença do DNA viral em pele, secreções oculares, orais e cloacais, sangue, urina e órgãos intra-cavitários de tartarugas marinhas saudáveis, não acometidas pela FP (ALFARO-NÚÑEZ et al., 2014; GATTAMORTA, 2016; PAGE-KARJIAN et al., 2015; MONEZI et al., 2016; ZAMANA, 2018; SILVA, 2019; LOGANATHAN et al., 2021; ROBBEN et al., 2023). A detecção do ChHV 5 em diferentes tecidos e fluidos corporais de tartarugas marinhas sem tumores, sugere infecções subclínicas e locais de persistência viral por infecção latente (PAGE-KARJIAN et al., 2012; ALFARO-NÚÑEZ et al. 2014). Considerando que animais assintomáticos possam atuar como reservatórios do vírus, entende-se a importância dos mesmos na disseminação da FP e manutenção do vírus no ambiente (ALFARO-NÚÑEZ et al, 2016).

Os herpesvirus de modo geral, estabelecem infecções sistêmicas pós-inoculação, momento em que ocorre viremia, indicativo de replicação viral. A presença do vírus no sangue pode ser detectada durante o ciclo lítico em infecções primárias sintomáticas ou subclínicas e/ou quando ocorre a reativação do vírus após um período de latência (PAILLOT et al., 2008; PAGE-KARJIAN et al., 2015). A circulação de DNA viral na corrente sanguínea pode sugerir um mecanismo de transporte do patógeno entre locais de persistência viral e tecido alvo (PAGE-KARJIAN et al., 2015).

Em estudo realizado por Page-Karjian et al. (2015) em que foram desenvolvidos ensaios de PCR quantitativo em tempo-real (qPCR) para quantificar DNA do ChHV 5 em diferentes tecidos e fluidos corporais de tartarugas marinhas com e sem FP, foi demonstrado que a carga de DNA viral na corrente sanguínea parece estar associada a carga de DNA viral na pele em animais infectados sem manifestação clínica da FP. De acordo com os dados obtidos neste estudo, os autores sugerem que em infecções subclínicas, a presença de DNA do ChHV 5 no sangue relacionada à presença de DNA na pele, indica que a natureza multicêntrica dos tumores de FP pode ser atribuída a circulação do vírus dentro de células infectadas na corrente sanguínea, por exemplo células tumorais circulantes (CTCs) e linfócitos.

Monezi *et al.*, (2006) analisaram o sangue e tumores de tartarugas marinhas com FP provenientes de Ubatuba (SP), confirmando a ocorrência do ChHV 5 na corrente sanguínea de 40% (4/10) dos animais. Em contrapartida, Lu et al. (2000) não identificaram o vírus em células mononucleares isoladas de sangue periférico por meio de nested PCR em animais com tumores, assim como Quackenbusch et al. (2001) por meio do qPCR. Mais recentemente, Page-Karjian *et al.* (2015) e Silva (2019), detectaram DNA viral em amostras de sangue de tartarugas marinhas com e sem FP, demonstrando a circulação do ChHV 5 na corrente sanguínea de animais sintomáticos e assintomáticos.

De acordo com Alfaro-Núñez et al. (2016), esclarecer como ocorre o processo de latência do ChHV 5 em tartarugas marinhas pode ter implicações relevantes para compreensão da patogênese da FP. Tartarugas marinhas aparentemente saudáveis podem atuar como reservatórios do vírus, como foi evidenciado por estudos em que demonstrou-se a presença de DNA do ChHV 5 em pele, secreções e sangue de animais assintomáticos por meio de técnicas de PCR (ALFARO-NÚÑEZ et al., 2014; GATTAMORTA, 2016; PAGE-KARJIAN et al., 2015; MONEZI et al., 2016; ZAMANA, 2018; SILVA, 2019; LOGANATHAN et al., 2021; ROBBEN et al., 2023). Investigar a ocorrência do ChHV 5 em populações de tartarugas verdes em áreas de alimentação, principalmente em indivíduos livres de FP, pode auxiliar a compreender aspectos da doença que ainda não foram elucidados e também no desenvolvimento de medidas de prevenção e controle (HERBST et al., 2008).

O conhecimento sobre o estado de saúde das populações selvagens é considerado imprescindível para o desenvolvimento de estratégias de conservação (DEEM, 2001). ChHV 5 possui distribuição global, acometendo tartarugas marinhas em todos os oceanos, demonstrando ser um patógeno de grande relevância científica, uma vez que afeta a saúde e sobrevivência de espécies ameaçadas de extinção. Esclarecer lacunas ainda não compreendidas de doenças emergentes como a fibropapilomatose está diretamente ligado à conservação de tartarugas marinhas, especialmente das tartarugas verdes.

Considerando o potencial dos herpesvirus em estabelecer infecções latentes e sua importância na manutenção da FP em populações de tartarugas marinhas, existe a necessidade de entender o papel desempenhado pela corrente sanguínea na evolução e disseminação da doença principalmente no que diz respeito ao mecanismo de transporte do ChHV 5 entre locais de persistência viral e tecido alvo, como citado por Page-Karjian et al. (2015).

Ainda que existam estudos envolvendo a detecção o ChHV 5 em variados tecidos de tartarugas marinhas acometidas ou não pela fibropapilomatose, são escassas as pesquisas que investigam e comparam a presença do vírus exclusivamente em sangue, em populações de *C. mydas* em diferentes áreas de alimentação, onde há aglomeração de indivíduos.

Neste contexto, o presente trabalho pretendeu investigar a ocorrência do Chelonid alphaherpesvirus 5 em amostras de sangue de tartarugas verdes (*C. mydas*) juvenis de vida livre acometidas ou aparentemente não acometidas pela FP capturadas em áreas de alimentação de diferentes regiões da costa brasileira, visando colaborar com estudos epidemiológicos da FP envolvendo investigação de infecções latentes e assim contribuir diretamente para a conservação das tartarugas marinhas.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência do Chelonid alphaherpesvirus 5 na corrente sanguínea de tartarugas-marinhas juvenis de vida livre da espécie *Chelonia mydas* acometidas ou aparentemente não acometidas pela fibropapilomatose, por meio de testes de amplificação gênica pela PCR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

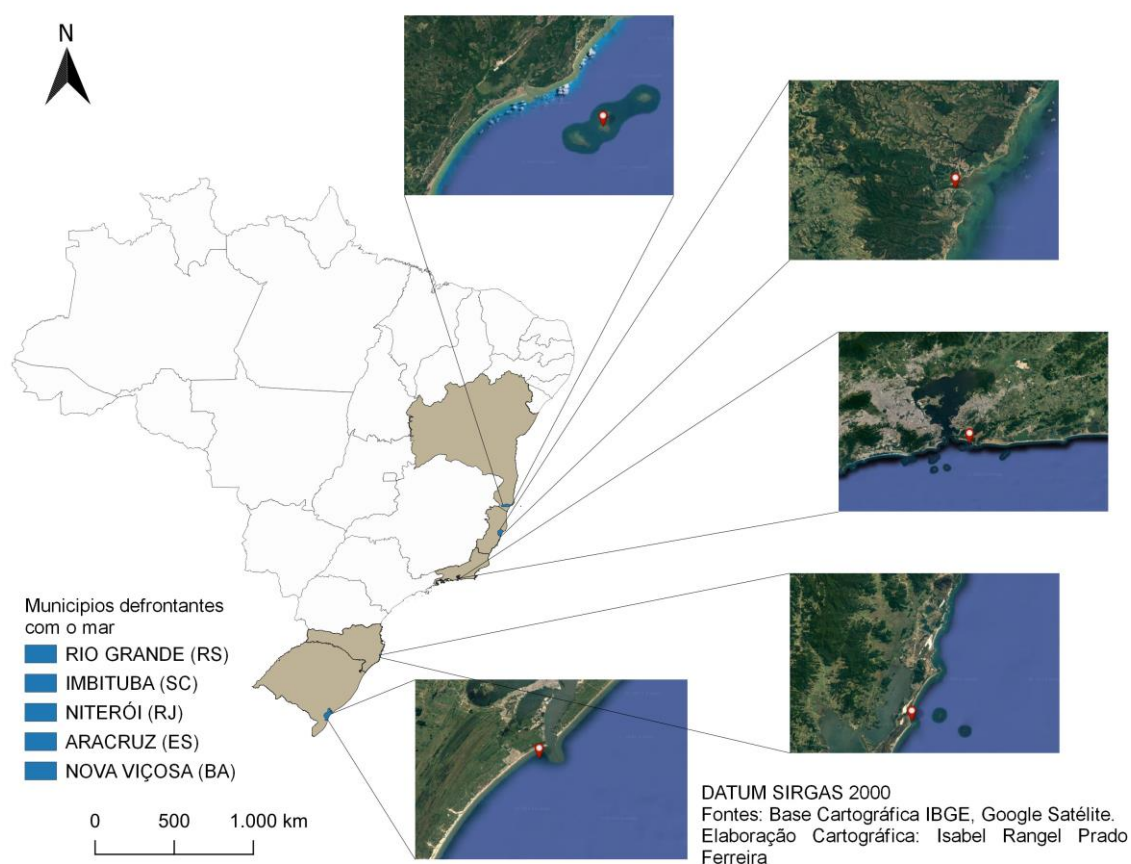
- Detectar a presença do ChHV 5 no sangue (viremia) de animais acometidos ou não acometidos pela FP, por meio de marcadores moleculares do tipo STS (sequence tagged sites);
- Determinar a prevalência da doença dentre os indivíduos *C. mydas* capturados em cada uma das áreas de estudo por meio da observação de tumores sugestivos da FP;
- Avaliar se existe correlação entre FPS (escore) e viremia em animais acometidos pela FP;
- Comparar os *primers* utilizados para detecção do DNA do ChHV 5 em sangue de *C. mydas*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREAS DE ESTUDO E CAPTURA INTENCIONAL

Foram coletadas amostras sanguíneas de tartarugas marinhas juvenis de vida livre da espécie *Chelonia mydas* capturadas em diferentes áreas de alimentação localizadas em cinco estados brasileiros: praia do Cassino – Rio Grande (RS), praia de Itapirubá – Imbituba (SC), praia de Itaipu – Niterói (RJ), Santa Cruz – Aracruz (ES) e Ilha de Coroa Vermelha – Nova Viçosa (BA) de acordo com as condutas exigidas pelo CEUA protocolo 0206/2021, sob licença Sisbio nº 80646.

Figura 4: Mapa de localização dos pontos de capturas intencionais



Na região abrangendo os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, os animais foram capturados de forma intencional por esforços da equipe do Projeto Caminho Marinho. Fundado em 2010, o projeto desenvolve atividades que buscam a conservação de fauna ameaçada de extinção visando o equilíbrio entre as múltiplas diversidades, ambiental, econômico e social.

A base do projeto está localizada na praia do Cassino (32° 09' 48" S, 52° 05' 46" W), município de Rio Grande (RS), que se inicia a partir do lado oeste dos molhes da Barra do Rio Grande. Os molhes apresentam papel ecológico fundamental, já que oferecem proteção e estrutura para fixação de diversas espécies marinhas, propiciando uma área abundante de algas, alimento principal da tartaruga verde (SOUZA, 2014). O projeto atua também na praia de Itapirubá Norte (28° 19' S, 48° 43' W), localizada no município de Imbituba (SC), que está inserida na Área de Proteção Ambiental (APA) da Baleia Franca. A região é caracterizada pela formação de cabos e costões rochosos entre praias, formando enseadas e baías acompanhadas de um cordão de dunas e lagoas costeiras, que apresentam rica biodiversidade de flora e fauna bentônica (SOUZA, 2014).

O projeto Caminho Marinho realiza capturas intencionais em todas as estações do ano, com intuito de registrar dados populacionais relevantes para conservação das tartarugas marinhas. As capturas são feitas por meio da disposição de redes de emalhe colocadas manualmente de forma estratégica. Ao mesmo tempo, uma equipe posicionada em terra, observa atentamente o momento em que ocorre o emalhe. Imediatamente o animal capturado é resgatado e estabilizado para ser transportado para a base, onde é feito o exame físico e coletas de dados e de amostras biológicas. A soltura dos animais hígidos capturados ou resgatados é feita no dia seguinte à captura ou resgate, no mesmo local onde foram encontrados.

Figura 5: Rede de emalhe Projeto Caminho Marinho nos Molhes da Barra da Praia do Cassino, Rio Grande (RS) para captura intencional de tartarugas-verdes (*C.mydas*) de vida livre



Fonte: arquivo pessoal

As tartarugas marinhas provenientes dos estados da Bahia e Espírito Santo foram capturadas intencionalmente como parte do trabalho desenvolvido pelo Projeto Chelonia mydas. O projeto Chelonia mydas é desenvolvido pelo Instituto Marcos Daniel (IMD), fundado em 2004 em Vitória (ES).

O projeto que monitora o impacto de poluentes sobre tartarugas marinhas, visa mapear e compreender os processos e a ocorrência de enfermidades nas populações destes animais em ambientes impactados pelo homem e ambientes preservados, para subsidiar ações conservacionistas, aperfeiçoar e aplicar técnicas de biomonitoramento ambiental e diagnóstico de enfermidades em tartarugas marinhas no Brasil. Sendo assim, a equipe organiza semestralmente saídas embarcadas com a intenção de realizar captura intencional de tartarugas marinhas de vida livre na praia de Santa Cruz (19° 57' 14" S, 40° 08' 58" W), estuário do Rio Piraqueaçu, município de Aracruz (ES), que está inserida na APA Costa das Algas da Unidade de Conservação Refúgio de Vida Silvestre de Santa Cruz e na Ilha de Coroa Vermelha (17° 58' 02" S, 39° 12' 30" W), município de Nova Viçosa (BA).

No estuário do Rio Piraqueaçu, existe ampla ocorrência de tartarugas verdes devido a abundância de algas no local. As capturas intencionais são feitas por meio da disposição de redes de emalhe colocadas estrategicamente pela equipe do projeto. As redes são monitoradas de forma contínua e os animais capturados são retirados com cuidado das redes e trazidos ao barco para estabilização. As tartarugas marinhas são então identificadas e em seguida, realiza-se a coleta de sangue e amostras biológicas seguida pelos exames físico e procedimentos de coleta de dados, biometria e marcação para identificação. Logo em seguida, os animais capturados são liberados de volta ao mar.

Figura 6: Rede de emalhe Projeto Chelonia mydas no estuário do Rio Piraqueaçu, Aracruz (ES) para captura intencional de tartarugas-verdes (*C. mydas*) de vida livre



Fonte: Camila Miguel

Basicamente o mesmo processo ocorre durante as capturas intencionais na Ilha de Coroa Vermelha. Ilhas oceânicas são importantes áreas de alimentação não somente para *C. mydas* como também para outras espécies de tartarugas marinhas. Porém, além de redes de emalhe, as capturas Nessa área são realizadas por pescadores colaboradores utilizando tarrafas. Isto

porque se trata de um ambiente com águas muito claras, permitindo uma fácil visualização das tartarugas marinhas forrageando próximos a costa da ilha.

Figura 7: Captura de tartaruga-verde (*C. mydas*) de vida livre com tarrafa na Ilha de Coroa Vermelha, Nova Viçosa (BA)



Fonte: Camila Miguel

No Rio de Janeiro, as amostras sanguíneas coletadas foram provenientes de animais capturados intencionalmente pelo Projeto Aruanã. Nascido em 2012, o projeto atua na região da Baía de Guanabara e tem como objetivo principal realizar o monitoramento e o levantamento da ocorrência de tartarugas marinhas na região metropolitana do Rio de Janeiro por meio da realização de pesquisas científicas. A partir de 2020, o projeto passou a integrar o Instituto de Pesquisas Ambientais Littoralis.

O projeto Aruanã realiza semestralmente atividades de captura intencional na praia de Itaipu (22° 58' 14" S, 43° 02' 48" W), Niterói (RJ). As tartarugas marinhas são capturadas por rede de pesca de arrasto-de-praia, que utiliza uma canoa a remo manejada por pescador parceiro juntamente com outros dois ou três integrantes do Projeto Aruanã. Deixando um cabo na praia, a canoa é deslocada para uma distância que varia entre 300 m e 500 m,

lançando a rede perpendicular à linha de costa. Retornando à praia, um segundo cabo é lançado e a equipe em terra inicia o processo de arrasto e recolhimento da rede em direção a areia. Conforme a rede é puxada, as tartarugas marinhas são trazidas até a praia. Os animais capturados são retirados da rede e trazidos à tenda que é montada pelo projeto Aruanã na praia, para estabilização. As tartarugas marinhas são identificadas e em seguida, realiza-se exame físico e procedimentos de coleta de dados, biometria, marcação com anilhas e coleta de amostras biológicas. Mais tarde, os animais capturados são liberados de volta ao mar.

Figura 8: Rede de arrasto-de-praia Projeto Aruanã para captura intencional de tartarugas-verdes (*C. mydas*) na praia de Itaipu, Niterói (RJ)



Fonte: arquivo pessoal

3.2 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS E DADOS BIOMÉTRICOS

A coleta de material para as análises moleculares aconteceu de modo a representar o menor risco possível à integridade física das tartarugas marinhas. Foram coletadas amostras sanguíneas de tartarugas marinhas com e sem fibropapilomatose, por meio da punção do seio venoso cervical, após contenção física do animal. Aproximadamente 2 mL de sangue de cada animal foi colhido utilizando agulhas 30x8 ou 40x12mm e seringas de 3 ou 5 mL, dependendo da condição corpórea e tamanho de cada animal e, depositados em tubos do tipo *Eppendorf* estéreis sem anticoagulante. Em campo, as amostras sanguíneas foram armazenadas em caixa térmica com gelo artificial e depois congeladas e mantidas a -8°C até serem trazidas ao Laboratório de Genética Animal (LGA) do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Botucatu. No laboratório, foram mantidas congeladas a -20° C até o processamento.

Figura 8: Coleta sanguínea por punção do seio venoso cervical em *C. mydas*



Fonte: arquivo pessoal

Também foram coletadas amostras de tumores cutâneos de tartarugas marinhas com FP capturadas na praia de Itaipu, Niterói (RJ). Pequenos fragmentos de tecido tumoral foram seccionados utilizando lâmina de bisturi estéril individualizada para cada animal e fragmento de tumor coletado, após higienização prévia da região com iodopovidona. Os fragmentos foram depositados em tubos tipo *Eppendorf* contendo solução de álcool 100% e armazenados a -20°C até o processamento no Laboratório de Genética Animal do Instituto de Biociências da UNESP Botucatu.

Todos os animais envolvidos no trabalho tiveram os dados biométricos coletados utilizando fita métrica, balança e paquímetro manual. Após contenção física, foram registrados: comprimento curvilíneo de carapaça (CCC), largura curvilínea de carapaça (LCC), massa corporal (MC) e número das anilhas de identificação.

3.3 ANÁLISES MOLECULARES

3.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA total das amostras de sangue total obtidas foi realizada pelo *Kit DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen). O DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer – Termo Fisher Scientific), por meio de absorbância a 260-280nm. A qualidade do material foi avaliada pela técnica de eletroforese em gel de agarose à 1,5%, corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen), imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido Acético-EDTA) e visualizados em digitalizador de imagens sob luz ultravioleta.

3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras biológicas foram submetidas a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase para detecção do Chelonid alphaherpesvirus 5. As PCRs foram realizadas em termociclador *Eppendorf® Mastercycler® Nexus X2*. Cada reação continha um volume final de 10 µL, incluindo 1,2 µL de

solução tampão, 0,4 µL de MgCl₂, 1 µL de dNTPs mix, 1 µL de cada *primer*, 0,1 µL de Taq DNA polimerase, 1 µL de DNA genômico e 4,3 µL de água ultrapura.

Cada ensaio foi composto por uma amostra de DNA extraído de fragmentos de fibropapilomas cutâneos previamente testada e confirmada positiva por Sequenciamento Sanger como controle positivo e água ultrapura como controle negativo, seguindo o seguinte perfil térmico: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 39 ciclos a 94°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos e 72° por 30 segundos e extensão final a 72° por 7 minutos.

Para detecção do ChHV 5 pela técnica de PCR, foram utilizados marcadores moleculares do tipo STS (*sequence tagged sites*). Os dois conjuntos de *primers* selecionados UL-18 e UL-30 têm como gene-alvo a proteína do capsídeo e a DNA polimerase respectivamente, e estão especificados na tabela a seguir:

Tabela 2: Conjunto de *primers* e as respectivas sequências de nucleotídeos, tamanho do fragmento e referências bibliográficas

PRIMERS	GENE-ALVO	SEQUÊNCIA DOS NUCLEOTÍDEOS (5'-3')	TAMANHO DO FRAGMENTO	REFERÊNCIA
UL-18	Proteína de capsídeo	F: GTGGAACCCCGCCGGGTAAT R: TGATCCGGGCCGAGTAGCGC	140 pb	Alfaro Nuñez; Gilbert, 2014
UL-30	DNA polimerase	F: AGCATCATCCAGGCCCAATCT R: CGGCCAGTTCGGCGCGTCGACCA	445pb	Lu <i>et al.</i> , 2000

3.3.3 Limiar de detecção dos *primers*

O limiar de detecção do DNA genômico dos conjuntos dos *primers* utilizados para a detecção do ChHV5 foi estimada pela avaliação da amplificação do DNA extraído de fibropapilomas cutâneos, confirmados positivos por sequenciamento Sanger e utilizados como controle positivo. As amostras foram diluídas em série na solução de DNA (Tabela 3) e foram feitas PCRs com os mesmos volumes, concentrações e perfis térmicos citados anteriormente.

Tabela 3: Avaliação da sensibilidade dos conjuntos de *primers* da detecção do DNA viral em diferentes diluições

Diluições	a	b	c	d	e	f	g	h
Quantidade de DNA por diluição (ng)	10	1	0,1	0,01	0,0001	0,00001	0,000001	0,0000001

3.3.4 Análise dos produtos de PCR

A identificação dos produtos amplificados nas reações foi feita por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose à 1,5%, corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen), imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido Acético – EDTA) corrido a 90 V por 1 hora. Os géis foram visualizados no transiluminador (Benchtop UV Transilluminator, Cambridge, Reino Unido) com o *software* UVP® *VisionWorksLSTM* (LifeScience Software) comparados a um padrão de peso molecular de 1 *Kb Plus* (Invitrogen). As amostras que revelaram bandas do tamanho do fragmento específico de cada gene bem como correspondiam a banda do tamanho do controle positivo foram consideradas positivas na detecção do DNA do ChHV 5.

3.3.5 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos

As amostras positivas foram submetidas a sequenciamento genético para confirmação do gene desejado pertencente ao ChHV 5, gerando consenso e possibilitando a confirmação em banco de dados.

Os fragmentos de interesse foram purificados utilizando-se a exonuclease EXOSAP-IT® (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific) para remoção de excesso de reagentes que pudessem interferir na reação de sequenciamento, seguindo protocolo descrito pelo fabricante. A cada 20 µL de produto de PCR obtido, acrescentou-se 8 µL da exonuclease. Em seguida os tubos foram levados ao termociclador Eppendorf® Mastercycler® Nexus X2 e submetidos ao seguinte programa de ciclagem: 15 minutos a 37°C e 15

minutos a 80°C. Após a purificação, 10 µL de cada amostra foram eluídos em 2,5 µL de água ultrapura Milli-Q e acrescidos de 2,5 µL de cada *primer* específico, *forward* e *reverse*. Os produtos finais contendo volume de 15 µL foram transportados sob refrigeração e encaminhados ao Instituto de Biotecnologia (IBTEC), unidade complementar da UNESP, câmpus de Botucatu.

Os resultados dos sequenciamentos realizados pelo IBTEC foram interpretados utilizando os programas Chromas e MEGA 11 afim de se obter a sequência de nucleotídeos gerada em cada amostra. As sequências foram analisadas e comparadas com as já descritas e depositas no *GenBank* (National Center for Biotechnology Information) utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

4. RESULTADOS

4.1 TARTARUGAS MARINHAS CAPTURADAS

4.1.1 Amostras biológicas e ocorrência de tumores de FP

Foram coletadas amostras sanguíneas de 157 tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) juvenis de vida livre acometidas e aparentemente não acometidas pela FP. Entre os animais capturados, 27,4% (43/157) apresentavam tumores sugestivos da FP, variando em tamanho, quantidade e coloração.

Tabela 4: Relação entre n° de animais capturados e presença ou ausência de tumores (FP) de acordo com local de origem

ORIGEM	FP+	FP-	TOTAL
BA	4	41	45
ES	24	21	45
RJ	7	13	20
RS	3	30	33
SC	5	9	14
GERAL	43	114	157

Figura 9: Massa tumoral em região cervical de indivíduo *C. mydas*



Fonte: arquivo pessoal

Figura 10: Tumores em olho esquerdo; região inguinal e plastrão e nadadeiras anteriores em *C. mydas*



Fonte: arquivo pessoal

Figura 11: Tumores em região cervical e nadadeira anterior em *C. mydas*



Fonte: arquivo pessoal

Figura 12: Tumores em nadadeira, região axilar e plastrão em *C. mydas*



Fonte: arquivo pessoal

Figura 13: Massa tumoral de grande dimensão em nadadeira e tumores em região cervical em *C. mydas*



Fonte: arquivo pessoal

4.1.2 Dados biométricos e escore de fibropapilomatose

Todos os animais envolvidos no trabalho tiveram os dados biométricos registrados após contenção física. As tartarugas marinhas analisadas apresentaram CCC médio de 41,8 cm, com valor mínimo de 31,7 cm e máximo de 74,2 cm; LCC médio de 37,6 cm com valor mínimo de 30,2 cm e máximo de 65,6 cm e MC média de 17,3 kg, com valor mínimo de 3,35 kg e máximo de 52,4 kg. Todos os animais foram classificados como juvenis.

Figura 14: Biometria de comprimento curvilíneo de carapaça (CCC) com fita métrica em *C. mydas*



Fonte: arquivo pessoal

Figura 15: Biometria de largura curvilínea de carapaça (LCC) com fita métrica em *C. mydas*



Fonte: arquivo pessoal

Figura 16: Pesagem de indivíduo *C. mydas* para determinar massa corpórea (MC)



Fonte: arquivo pessoal

Em tartarugas marinhas que apresentavam tumores sugestivos de FP, foram coletados dados referentes aos mesmos. Os fibropapilomas foram quantificados e classificados de acordo com o tamanho, seguindo método descrito por Work e Balazs (1999): A ($< 1\text{cm}$), B ($1\text{cm} \leq \text{FP} \leq 4\text{ cm}$), C ($4\text{ cm} < \text{FP} \leq 10\text{ cm}$) e D ($> 10\text{ cm}$). Os tumores foram descritos a partir de sua localização anatômica: olhos, boca, pescoço, nadadeira anterior, nadadeira posterior, cloaca, cauda, plastrão e carapaça.

Figura 17: Quantificação e mensuração de tumores característicos de FP em indivíduo *C.mydas*



Fonte: arquivo pessoal

A classificação dos tumores de acordo com Work e Balazs permite o cálculo do índice de fibropapilomatose (FPI) proposto por Rossi et al., 2016 por meio da equação:

$$\text{FPI} = 0.1 \times N_A + 1 \times N_B + 20 \times N_C + 40 \times N_D$$

onde, N_x é o número de tumores quantificados em cada categoria (A, B, C, D). Os resultados dessa equação, permitem classificar o escore de fibropapilomatose (FPS) ou grau de severidade da doença em “leve” quando $\text{FPI} < 40$, “moderado” quando $40 \leq \text{FPI} < 120$ ou “severo” quando $\text{FPI} > 120$.

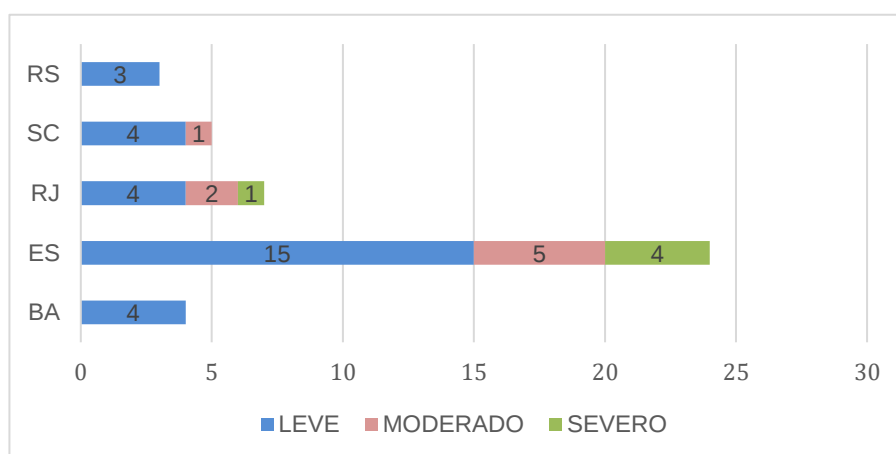
Por meio da classificação dos tumores, foi possível calcular o Índice de fibropapilomatose (FPI) e o grau de severidade (FPS) da doença nos animais envolvidos no estudo. Entre as 43 tartarugas marinhas que apresentavam tumores característicos de FP, 30 animais (69,8%) apresentaram escore grau leve, 8 animais (18,6%) apresentaram grau moderado e 5 animais apresentaram (11,6%) grau severo.

Tabela 5: Relação entre índice de fibropapilomatose (FPI), escore de severidade (FPS) e origem dos animais

AMOSTRA	ORIGEM	FPI	FPS
76	BA	0,2	leve
77	BA	10,1	leve
78	BA	2,3	leve
97	BA	2	leve
30	ES	20,4	leve
31	ES	149,5	severo
32	ES	12,6	leve
34	ES	5,5	leve
35	ES	7,2	leve
36	ES	12	leve
37	ES	15,4	leve
38	ES	0,1	leve
40	ES	18,9	leve
41	ES	1,6	leve
42	ES	28,7	leve
45	ES	187,2	severo
47	ES	76,5	moderado
48	ES	1,2	leve
49	ES	165,5	severo

50	ES	13,3	leve
51	ES	5,4	leve
55	ES	39,6	leve
57	ES	2,9	leve
58	ES	48,9	moderado
59	ES	51,3	moderado
61	ES	63,8	moderado
65	ES	129,4	severo
71	ES	50,3	moderado
19	SC	13,4	leve
20	SC	47,3	moderado
22	SC	3,8	leve
23	SC	9,5	leve
26	SC	17,6	leve
9	RS	3,1	leve
13	RS	16,7	leve
133	RS	22,2	leve
142	RJ	20,1	leve
145	RJ	96,7	moderado
146	RJ	33,8	leve
149	RJ	39,2	leve
153	RJ	26,5	leve
155	RJ	158,3	severo
157	RJ	49,9	moderado

Gráfico 1: Relação entre n° de animais FP+ e escore de severidade (FPS) de acordo com local de origem



4.2 ANÁLISES MOLECULARES

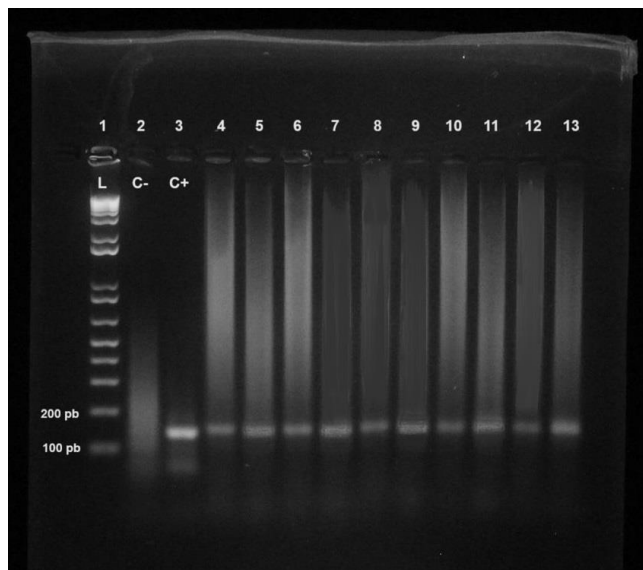
As amostras sanguíneas testadas apresentaram concentração de DNA entre 30 e 50ng/ μ L e relação 260/280 entre 1,5 e 2,1, indicando estarem satisfatórias para as análises moleculares propostas.

De um total de 157 (100%) amostras de sangue de *C. mydas* submetidas a PCR convencional, foi detectado a presença do gene da proteína do capsídeo do ChHV 5 em 13 (8,2%) indivíduos. Entre os 13 animais considerados positivos, 7 apresentavam manifestação clínica da FP (ID 19, 31, 45, 58, 65, 77, 146) e 6 eram assintomáticos (ID 39, 53, 70, 91, 110, 154).

Tabela 6: Relação entre n° de animais com e sem FP detectados positivos pela PCR utilizando conjunto de *primers* UL-18, de acordo com local de origem

ORIGEM	FP+	FP-	TOTAL
SC	1	0	1
ES	4	3	7
BA	1	2	3
RJ	1	1	2

Figura 18: Amostras sanguíneas: produtos de PCR amplificados no fragmento do gene da proteína de capsídeo do ChHV 5 (140 pb) em gel de agarose 1,5%.

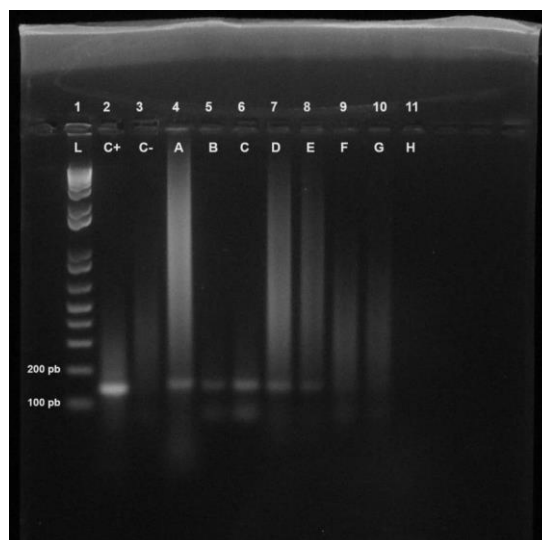


Coluna 1: *Ladder 1 Kb Plus* (Invitrogen); Coluna 2: Controle negativo; Coluna 3: Controle positivo do gene da proteína de capsídeo do ChHV 5; Coluna 4 a 13: Amplicons de amostras de DNA extraído de sangue de *C. mydas* em estudo (ID 31, 39, 53, 65, 70, 77, 91, 110, 146, 154)

Em contrapartida, as mesmas amostras não amplificaram no fragmento do gene da DNA polimerase do ChHV 5. Desta forma, o *primer* UL-30 não detectou a presença do vírus no sangue de nenhum dos 157 animais envolvidos nesta pesquisa.

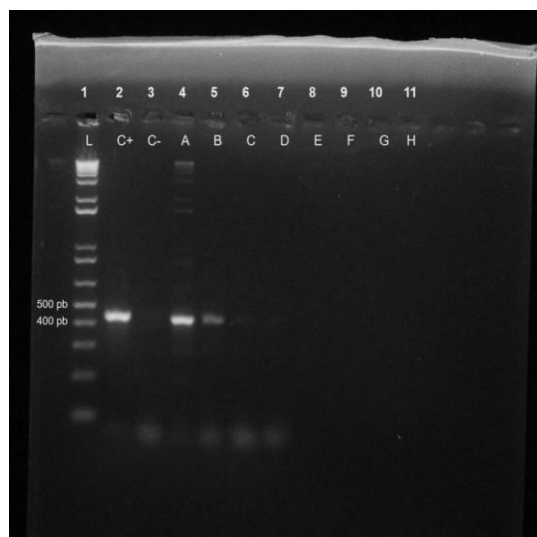
Em relação ao limiar de detecção dos *primers* e, consequentemente, uma validação de nossas análises, houve amplificação do fragmento desejado do gene da DNA polimerase (UL-30) do ChHV 5 até a diluição de 1 ng de DNA genômico extraído de amostra de tecido tumoral de *C. mydas*. Já para o gene da proteína do capsídeo, o conjunto de *primers* UL-18 se mostrou mais sensível, amplificando o fragmento desejado até a diluição de 0,0001 ng de DNA genômico.

Figura 19: Teste de limiar de detecção: amostras A – H diluídas a partir do C+ para determinar sensibilidade do primer UL-18 (140 pb) na detecção do ChHV 5



Coluna 1: *Ladder 1 Kb Plus* (Invitrogen); Coluna 2: Controle positivo do gene da proteína de capsídeo do ChHV 5; Coluna 3: Controle negativo Coluna 4 a 11: Amostras de DNA do ChHV 5 na concentrações A=10; B=1; C=0,1; D=0,01; E=0,001; F=0,0001; G=0,00001; H=0,000001 ng respectivamente.

Figura 20: Teste de limiar de detecção: amostras A – H diluídas a partir do C+ para determinar sensibilidade do *primer* UL-30 (445 pb) na detecção do ChHV 5



Coluna 1: *Ladder 1 Kb Plus* (Invitrogen); Coluna 2: Controle positivo do gene da DNA polimerase do ChHV 5; Coluna 3: Controle negativo Coluna 4 a 11: Amostras de DNA do ChHV 5 na concentrações A=10; B=1; C=0,1; D=0,01; E=0,001; F=0,0001; G=0,00001; H=0,000001 ng respectivamente.

4.3 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

Inicialmente dois produtos de PCR, provenientes de amostras de tecido tumoral cutâneo de um mesmo indivíduo *C. mydas* (ID 155), que amplificaram nos fragmentos dos genes desejados referentes ao conjunto de *primers* UL-30 e UL-18, foram purificados e encaminhados para sequenciamento genético, visando confirmação e comparação em banco de dados.

Para avaliar a identidade entre as sequências geradas e as descritas no *Genbank*, foram analisados fragmentos parcial do gene da DNA polimerase e gene da proteína de capsídeo do ChVH 5. Foi possível observar que para fragmentos de 376 pb da DNA polimerase, a identidade da sequência obtida foi de 100% com as sequências MH144348.1 (Paraná – Brasil), MH101744.1 (São Paulo – Brasil), KU048040.1 (Paraná – Brasil), KR048335.1 (São Paulo – Brasil), MT272982.1 (São Paulo – Brasil), JN938586.1 (Rio Grande do Sul – Brasil), JN580279.1 (Porto Rico), MK953552.1 (São Paulo – Brasil), HQ000007.1 (São Tomé e Príncipe), HM348896.1 (São Tomé e Príncipe), HM348895.1 (São Tomé e Príncipe). Para fragmentos parcial de 81 pb da proteína de capsídeo, a identidade da sequência obtida foi de 100% com as sequências OQ189658.1 (Malásia), OQ189660.1 (Malásia) e 98% com as sequências KY933584.1 (Taiwan), KY933583.1 (Taiwan), NC_075701.1 (Estados Unidos) e LC536649.1 (São Paulo – Brasil).

As amostras de tumores cutâneos confirmadas positivas após análise e comparação em banco de dados (*Genbank*), foram utilizadas como controle positivo nas PCRs realizadas neste estudo para detecção do ChHV 5 em amostras de sangue.

Para validação dos resultados obtidos referente às análises das amostras sanguíneas, dois produtos de PCR provenientes de um indivíduo que apresentava tumores de FP (ID 146) e um indivíduo aparentemente assintomático (ID 154) foram purificados e encaminhados para sequenciamento genético.

As sequências de nucleotídeos obtidas a partir de ambas amostras sanguíneas foram muito semelhantes entre si. A identidade das sequências obtidas foi de 95 a 100% com as sequências OQ189658.1 (Malásia),

OQ189660.1 (Malásia), KY933584.1 (Taiwan), KY933583.1 (Taiwan),
NC_075701.1 (Estados Unidos).

5. DISCUSSÃO

5.1 DADOS BIOMÉTRICOS E PREVALÊNCIA DA FP

A fibropapilomatose (FP) possui distribuição circuntropical, acometendo tartarugas marinhas em todos os oceanos (BAPTISTOTTE, 2007). Apesar de seu caráter benigno, é uma enfermidade debilitante e potencialmente fatal (AGUIRRE, 1998). O Chelonid alphaherpesvirus 5 (ChHV 5) é descrito como agente etiológico da doença, porém há um consenso na literatura científica de que a FP tem caráter multifatorial, estando associada a fatores ambientais e possivelmente genéticos (QUACKENBUSH, 1998; AGUIRRE, LUTZ, 2004). Ambientes costeiros afetados diretamente por atividades antrópicas apresentaram maiores prevalências de FP (BALAZS, 1991; ADNYANA et al., 1997; FOLEY et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2010; VAN HOUTAN et al., 2010).

No presente estudo, tartarugas verdes (*C. mydas*) juvenis foram capturadas em diferentes áreas de alimentação de cinco estados brasileiros: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia. A frequência de indivíduos capturados apresentando tumores sugestivos da doença variou bastante entre os locais de capturas. As prevalências mais baixas foram observadas na Ilha de Coroa Vermelha (BA) e na praia do Cassino (RS). A prevalência de FP constatada na praia de Itaipu (RJ) e na praia de Itapirubá (SC) foram semelhantes entre si. Já no estuário do Rio Pirequeaçu (ES), foi registrada a maior prevalência de FP, com mais da metade das tartarugas marinhas capturadas apresentando tumores cutâneos, conforme demonstra a Tabela 7:

Tabela 7: Relação entre nº de animais capturados em cada região e prevalência da FP (2023)

LOCAL	CAPTURAS	FP+	PREVALÊNCIA (%)
BA	45	4	8,8
ES	45	24	53,3
RJ	20	7	35
RS	33	3	9
SC	14	5	35,7
TOTAL	157	43	27,3

Nos estudos de fibropapilomatose, a coleta de dados biométricos tem sido muito utilizada e útil para estimar a faixa etária dos animais acometidos pela doença. Nesta pesquisa, os dados biométricos registrados, revelaram que os animais capturados apresentavam CCC médio variando entre 31,7 cm e 74,2 cm, sendo portanto classificados como juvenis, conforme Wyneken (2003).

Entre os 43 indivíduos FP+ capturados, o aspecto macroscópico dos tumores, demonstrou-se sugestivo da doença. Os animais tiveram os tumores descritos segundo sua localização anatômica e foram quantificados e classificados seguindo método descrito por Work e Balazs (1999). A classificação dos tumores permite o cálculo do índice de fibropapilomatose (FPI) proposto por Rossi et al., 2016. A partir do FPI, foi possível determinar o grau de severidade (FPS) da doença, revelando que 69,8% (30/43) dos animais apresentavam escore grau leve, 18,6% (8/43) dos animais apresentavam escore grau moderado e 11,6% (5/43) dos animais apresentavam escore grau severo. Os resultados estão de acordo com dados analisados por Baptistotte (2007) e Rossi et al. (2016), que descreveram *C. mydas* encontradas no Brasil, apresentando elevadas quantidades de pequenos tumores classificados nas categorias A e B, segundo método de Work e Balazs (1999).

5.2 TESTES MOLECULARES E DETECÇÃO DO ChHV 5

Assim como outros herpesvirus, acredita-se que o ChHV 5 seja capaz de estabelecer infecções latentes em seus hospedeiros naturais (ALFARO-NÚÑEZ et al., 2016). A quebra da latência ocorre quando há o comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro infectado, seja por fatores ambientais ou genéticos. No momento em que é reativado, o vírus pode manifestar-se clinicamente ou infectar novos indivíduos. (STRAUSS, 2006; NATHANSON, 2007).

O tecido alvo do ChHV 5 aparenta ser a pele e acredita-se que a transmissão ocorra primariamente por meio da descamação de células da epiderme de tartarugas marinhas infectadas pelo vírus no ambiente, principalmente nas áreas de alimentação, onde há aglomeração de animais (HERBST et al., 1995, 1999; WORK et al., 2014).

Testes de amplificação gênica por meio da técnica de PCR já detectaram o ChHV 5 em pele, órgãos intra-cavitários, sangue, urina e secreções de tartarugas marinhas com e sem tumores sugestivos da FP. Devido ao mecanismo de latência, animais infectados pelo ChHV 5, ainda que sejam assintomáticos, podem atuar como reservatórios, contribuindo com a disseminação da FP e persistência do vírus no ambiente. Desta maneira, entende-se a importância de investigar a ocorrência do vírus em tecidos e fluidos de animais sem FP.

Alfaro-Núñez et al., (2016) realizaram ensaios de qPCR para quantificar carga viral do ChHV 5 em amostras tumorais e de fragmentos de pele de tartarugas marinhas sintomáticas e assintomáticas. Os resultados revelaram que os animais com FP, apresentavam elevadas concentrações de DNA viral nos tumores e menores concentrações na pele. No entanto, em animais assintomáticos, as concentrações de DNA quantificadas na pele apresentaram-se elevadas, sendo maiores que as apresentadas na pele dos animais sintomáticos. Sendo assim, acredita-se que uma grande proporção de populações de tartarugas marinhas clinicamente saudáveis ao redor do mundo, carregam ChHV 5 provavelmente por infecções latentes persistentes (ALFARO-NÚÑEZ et al., 2016).

A viremia pode ser detectada durante o ciclo lítico, quando há replicação viral. A presença do vírus no sangue pode ser encontrada em infecções primárias sintomáticas, subclínicas e/ou quando ocorre a reativação do vírus após um período de latência (PAILLOT et al., 2008; PAGE-KARJIAN et al., 2015). A circulação do ChHV 5 na corrente sanguínea pode sugerir um mecanismo de transporte do patógeno entre locais de persistência viral, a partir de sítios de infecção inicial ou latência e tecido alvo (PAGE-KARJIAN et al., 2015).

Tal mecanismo de transporte entre locais de persistência viral e tecido alvo (ou vice-versa) através da circulação sanguínea, como citado por Page-Karjian et al. (2015), é um importante aspecto a ser compreendido, uma vez que contribui com: 1) a dispersão viral no organismo do hospedeiro, favorecendo a evolução da doença 2) a persistência do vírus em populações de *Chelonia mydas* e consequentemente a transmissão da FP para novos indivíduos.

Na literatura a detecção de Chelonid alphaherpesvirus 5 em amostras de sangue total de tartarugas marinhas sintomáticas e assintomáticas, foi demonstrada utilizando técnicas de PCR convencional, qPCR e nested PCR. No Brasil, o primeiro estudo envolvendo a detecção do ChHV 5 em sangue de tartarugas marinhas, foi realizado por Monezi et al. (2006), porém incluía apenas animais com manifestação clínica da FP e foi utilizado exclusivamente o conjunto de *primers* do gene da DNA polimerase (UL-30).

Posteriormente, Silva (2019) no Brasil e Page-Karjian et al. (2015) nos Estados Unidos, detectaram DNA viral em amostras sanguíneas de tartarugas marinhas com e sem tumores sugestivos de FP, demonstrando a circulação do ChHV 5 na corrente sanguínea de animais sintomáticos e assintomáticos. Os dois estudos utilizaram novamente o conjunto de *primers* UL-30 (~480 pb) e no caso de Silva (2019), foram incluídos outros três conjuntos de *primers* direcionados a diferentes genes-alvos do ChHV 5 e com tamanhos variados: UL-18 (gene da proteína do capsídeo com 140 pb), UL-27 (gene da glicoproteína B com 143 pb) e F-US3B (gene da serina/treonina quinase com 700 pb). O estudo de Silva (2019), foi o primeiro a utilizar diferentes *primers* para detecção do DNA do ChHV 5 em sangue de tartarugas marinhas. O conjunto de *primers* UL-18 demonstrou-se o mais sensível, sendo o responsável pela maior parte das detecções do vírus em amostras de sangue.

Em 2014, Alfaro e Gilbert testaram a sensibilidade de *primers* com diferentes tamanhos (pb) e genes-alvos para detecção do ChHV 5 em tumores e fragmentos de pele de tartarugas marinhas acometidas ou não pela FP, por meio de diferentes técnicas de PCR. No trabalho foi discutido que metodologias envolvendo a amplificação de *primers* com sequências menores como o UL-18 (140 pb) em comparação com *primers* que amplificam sequências maiores como UL-30 (445 pb), demonstram maior sensibilidade para a detecção do ChHV 5.

No presente estudo, foram selecionados os conjuntos de *primers* UL-30 e UL-18 para detecção do ChHV 5 em amostras sanguíneas de *C. mydas*. UL-30 foi utilizado visando seguir um padrão das pesquisas que buscam a detecção do ChHV 5 em diferentes tecidos pela técnica de PCR, uma vez que se trata do marcador molecular mais amplamente usado para este tipo de investigação. O *primer* UL-18, foi utilizado devido sua elevada sensibilidade na

detecção do DNA viral em sangue, demonstrada em pesquisa realizada por Silva (2019).

Em relação a detecção do vírus utilizando UL-18, 8,3% (13/157) das amostras sanguíneas amplificaram no tamanho (140 pb) do gene desejado, sendo portanto consideradas positivas. Destas 13 amostras, 7 eram de animais acometidos pela FP, que apresentavam tumores sugestivos e 6 eram animais sem manifestação cutânea da doença. A detecção do vírus se deu em amostras sanguíneas de tartarugas marinhas apresentando escore de FP (FPS) leve, moderado e severo. Uma vez que a detecção do vírus em sangue é indicativo de viremia, entende-se que a replicação viral independe da severidade da doença. A relação entre o número de amostras sanguíneas coletadas em cada uma das áreas de estudo, detecção do ChHV 5 utilizando os conjuntos de *primers* UL-18 e UL-30, presença ou ausência de tumores sugestivos de FP e o grau de severidade (FPS) da doença está descrita na Tabela 8:

Tabela 8: Relação entre número de amostras de sangue coletadas em cada área de estudo, detecção do ChHV 5 por meio da PCR de acordo com os conjuntos de *primers* UL-18 e UL-30, presença ou ausência de tumores sugestivos de FP e grau de severidade (FPS) da FP

LOCAL	AMOSTRAS	PCR		PRESENÇA DE TUMOR			
		UL 18	UL 30	SIM			NÃO
				LEVE	MODERADO	SEVERO	
BA	45	3	0	1	0	0	2
ES	45	7	0	0	1	3	3
RJ	20	2	0	1	0	0	1
SC	14	1	0	1	0	0	0
RS	33	0	0	0	0	0	0
TOTAL	157	13	0	3	1	3	6

Em contrapartida, as 157 amostras sanguíneas testaram negativo para a presença do gene alvo da DNA polimerase do genoma do ChHV 5, o que não corresponde aos resultados obtidos em estudos brasileiros anteriores (MONEZI et al., 2006; SILVA, 2019). Quackenbusch et al. (2001), por outro lado, ao analisarem amostras de sangue total de animais FP+ pela técnica de qPCR buscando o gene da DNA polimerase, não encontraram animais positivos. Assim como Lu et al. (2000) que não detectaram presença da DNA polimerase

do ChHV 5 em células mononucleares isoladas de sangue periférico de animais FP+ por meio da nested PCR.

Neste trabalho, a circulação do ChHV 5 na corrente sanguínea foi demonstrada em tartarugas marinhas *C. mydas* com tumores cutâneos sugestivos da FP e assintomáticas. A viremia é indicativo de replicação viral e quando detectada em animais com manifestação clínica cutânea da FP, sugere infecção sistêmica disseminada. Em animais sem manifestação clínica da FP, a viremia possivelmente indica disseminação hematogênica intermitente relacionada a infecções latentes persistentes. Levando em consideração as hipóteses de Paige-Karjian et al. (2015), a presença do ChHV 5 no sangue destes animais pode estar associada a reativação do vírus após período de latência. Além disso, a viremia em indivíduos assintomáticos também pode estar associada a replicação viral em infecções primárias ou subclínicas.

De qualquer forma, a circulação do ChHV 5 no sangue de tartarugas marinhas aparentemente saudáveis, confirma que mesmo na ausência da manifestação clínica da FP, o patógeno pode se disseminar no organismo dos hospedeiros e que de fato, estes animais podem atuar como reservatórios e consequentemente contribuir para manutenção da doença no ambiente.

Para validação dos resultados moleculares, produtos de amplificação da proteína de capsídeo do gene UL-18 do ChHV 5 provenientes de amostras de sangue de um indivíduo sintomático (ID 146) e um indivíduo aparentemente livre de FP (ID 156) foram submetidos a sequenciamento genético do tipo Sanger. As sequências de nucleotídeos geradas foram muito semelhantes entre si, obtendo 95 – 100% de identidade com sequências de tumor cutâneo e pele provenientes da Malásia, Taiwan e Estados Unidos.

A partir dos resultados do sequenciamento genético foi possível constatar que um mesmo haplótipo viral é capaz de infectar diferentes tecidos, uma vez que as sequências encontradas em amostras de tumores cutâneos e sangue foram as mesmas encontradas em outros tecidos.

O monitoramento da fibropapilomatose serve como um indicador da saúde do ecossistema marinho, uma vez que afeta espécies ameaçadas, consideradas sentinelas deste ambiente. Hamman et al. (2010), citaram a fibropapilomatose na lista de prioridades para estudos na área da conservação de tartarugas marinhas, uma vez que compromete a sobrevivência de espécies

ameaçadas de extinção. Os resultados obtidos neste estudo fornecem informações sobre a ocorrência de possíveis infecções latentes e/ou subclínicas, que estão relacionadas a questões epidemiológicas da FP, visando colaborar com a conservação das tartarugas marinhas e consequentemente do ecossistema marinho como um todo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foram utilizados testes moleculares para investigar a ocorrência do Chelonid alphaherpesvirus 5 no sangue de tartarugas verdes (*C. mydas*) de vida livre com tumores cutâneos sugestivos da FP e assintomáticas, afim de contribuir com a compreensão de aspectos epidemiológicos da doença.

Os animais amostrados foram capturados em áreas de alimentação localizadas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia. De forma geral, a prevalência de indivíduos capturados em vida livre que apresentavam tumores sugestivos da fibropapilomatose foi de 27,4% (43/157). A maior prevalência da doença foi registrada no estuário do Rio Piraqueaçu (ES), onde 53,3% dos animais eram FP+. Entre as tartarugas marinhas capturadas na praia de Itapirubá (SC) e praia de Itaipu (RJ), a prevalência da doença ficou em torno de 35%. As menores prevalências foram encontradas entre os animais capturados na praia do Cassino (RS) e Ilha de Coroa Vermelha (BA), que foi próxima a 9%.

Por meio da técnica de PCR convencional foi detectada a presença de DNA do ChHV 5 utilizando o conjunto de *primers* UL-18 em amostras de sangue de 13 animais. Dentre os animais positivos, 7 apresentavam tumores cutâneos e 6 eram livres de tumores. A detecção do patógeno em indivíduos clinicamente sadios ressalta o caráter multifatorial da FP e destaca o potencial do ChHV 5 em estabelecer infecções latentes. A corrente sanguínea possivelmente indica um meio de transporte do ChHV 5 entre sítios de persistência viral (latência ou infecções primárias) e tecido alvo.

A detecção do vírus se deu em tartarugas marinhas apresentando escore de FP (FPS) leve, moderado e severo. Uma vez que a detecção do vírus em sangue é indicativo de viremia, entende-se que a replicação viral independe da severidade da doença.

De acordo com os testes de limiar de detecção dos marcadores moleculares utilizados nesta pesquisa, UL-18 revelou-se sensível na amplificação do fragmento do gene da proteína do capsídeo do ChHV 5 em amostras contendo até 0,0001 ng de DNA genômico. Por outro lado, na avaliação da sensibilidade do *primer* UL-30 houve amplificação do fragmento do gene alvo em amostras contendo até 1 ng de DNA genômico.

Presume-se que a diferença observada entre os resultados obtidos pelos dois *primers* na detecção do vírus esteja relacionada a sua sensibilidade. No entanto, para confirmação desta hipótese, o emprego da técnica de PCR quantitativa em tempo real seria ideal.

Porém, a partir dos resultados obtidos, pode-se inferir que o conjunto de *primers* UL-18 é de fato mais sensível, revelando ser o marcador molecular preferível na detecção do ChHV 5 em amostras sanguíneas utilizando PCR convencional, especialmente para determinação de indivíduos portadores do vírus sem manifestação clínica cutânea da FP.

Testes de amplificação gênica para detecção do vírus em diferentes amostras biológicas de animais assintomáticos são eficientes para avaliar a frequência de portadores do vírus, que desempenham papel relevante na disseminação viral e manutenção da FP no ambiente.

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

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

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, n. 3, p. 283-289, 1999.

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.; 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.

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.

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

ALFARO-NÚÑEZ, A.; FROST BERTELSEN, M.; BOJESSEN, A. M.; RASMUSSEN, I.; ZEPEDA-MENDOZA, L.; TANGE OLSEN, M.; GILBERT, M. T. P. Global distribution of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus among clinically healthy sea turtles. *BMC Evolutionary Biology*, v. 14, p. 1-12, 2014.

ALFARO-NUÑEZ, A.; BOJESSEN, 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 turtles. *PeerJ* 4:e2274, 2016.

BALAZS, G. H. Current status of fibropapillomas in the Hawaiian green turtle, *Chelonia mydas*. Research plan for marine turtle fibropapilloma, p. 47-57, 1991.

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

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

BOUCHARD, S. S.; BJORNDAL, K. A. Sea turtles as biological transporters of nutrients and energy from marine to terrestrial ecosystems. *Ecology*, v. 81, n. 8, p. 2305-2313, 2000.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção 2022. Disponível em: <www.mma.gov.br>. Acesso em 13 ago. 2022

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

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 NaturalHistory*, v.162, n.1, p.1-46, 1978.

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

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.

CHAVES, A.; AGUIRRE, A.A.; BLANCO-PEÑA, K.; MOREIRA-SOTO, A.; MONGE, O.; TORRES, A.M.; SOTO-RIVAS, J.L.; LU, Y.; CHACÓN, D.; FONSECA, L.; JIMÉNEZ, M.; GUTIÉRREZ-ESPELETA, G.; LIERZ, M. Examining the Role of Transmission of Chelonid Alphaherpesvirus 5. *Ecohealth*, v. 14, p. 530-541, 2017.

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.

CURRY, S.S. Persistent infectivity of a disease-associated herpesvirus in green turtle after exposure to seawater. *Journal of Wildlife Diseases*, Ames, v. 39, n. 4, p. 792-797, 2000.

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.; POPPENG, R.H.; NORTON, T.M.; KARESH, W.B. Blood values of 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.

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

DOS SANTOS, R. G., MARTINS, A. S., TOREZANI, E., BAPTISTOTTE, C., DA NÓBREGA FARIAS, J.; HORTA, P. A.; BALAZS, G. H. Relationship between fibropapillomatosis and environmental quality: a case study with *Chelonia mydas* off Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 89, n. 1, p. 87-95, 2010.

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.

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 indicator of change: health of the oceans from Labrador to Venezuela. Boston: The Center of Health and the Global Environment, Harvard Medical School, Oliver Wendell Holmes Society, 1998, 85p.

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

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANIHOFF, J.; DESSELBERG, U.; BALL, L.A. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

FICHI, G.; CARDETI, G.; CERSINI, A.; MANCUSI, C.; GUARDUCCI, M.; DI GUARDO, G.; TERRACCIANO, G. Bacterial and viral pathogens detected in

sea turtles stranded along the coast of Tuscany, Italy. *Veterinary microbiology*, v. 185, p. 56-61, 2016.

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 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. Melbourne, Australia, 2010b.

FOLEY, A. M.; SCHROEDER, B. A.; REDLOW, A. E.; FICK-CHILD, K. J.; TEAS, W. G. Fibropapillomatosis in stranded green turtles (*Chelonia mydas*) from the eastern United States (1980–98): trends and associations with environmental factors. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 41, n. 1, p. 29-41, 2005.

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

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. 2016. Tese (Doutor em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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.

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.

GREENBLATT, R. J.; WORK, T. M.; DUTTON, P.; SUTTON, C. A.; SPRAKER, T. R.; CASEY, R. N.; CASEY, J. W. Geographic variation in marine turtle

fibropapillomatosis. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, Washington, v.35, p.527-530, 2005.

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.

HAMMAN, M.; GODFREY, M.H.; SEMINOFF, J.A.; ARTHUR, K.; BARATA, P.C.R.; BJORNDAAL, 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.

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.

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

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.; 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.; JACOBSON, E.R.; MORETTI, B.; BROWN, T.; SUNDBERG, 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, Washington, v.103. n.4, p. 27-30, 1995b.

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

ICMBio, 2023. Listas das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Portaria MMA nº 148/2022. Disponível em:

<<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies>>. Acesso em 01 de Fevereiro de 2023.

ICTV, 2023. Virus Taxonomy: 2023 Release. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em 05 de Abril de 2023.

IUCN, 2023. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2023.

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, p.73-89, 1986.

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.

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.

JACKSON, J. B. C.; KIRBY, M. X., BERGER, W. H.; BJORNDAL, K. A.; BOTSFORD, L. W.; BOURQUE, B. J.; WARNER, R. R. Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. science, v. 293, n. 5530, p. 629-637, 2001.

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.

JONES, K.; BURGESS G.; BUDD, A.M.; HUERLIMANN, R.; MASHKOUR, N.; ARIEL, E. Molecular evidence for horizontal transmission of chelonid alphaherpesvirus 5 at green turtle (*Chelonia mydas*) foraging grounds in Queensland, Australia. PLoS ONE 15(1): e0227268, 2020.

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.

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

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.

LOGANATHAN, A. L.; PALANIAPPAN, P.; SUBBIAH, V. K. First Evidence of Chelonid Herpesvirus 5 (ChHV5) Infection in Green Turtles (*Chelonia mydas*) from Sabah, Borneo. Pathogens, v. 10, n. 11, p. 1404, 2021.

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.

LUTZ, P.L.; MUSICK, J.A. The biology of sea turtles. London: CRC Press, v. 1, 1997. 446p.

MARCOVALDI, M. A. A. G. D.; SANTOS, A. S.; dos SALES, G. (Org.). *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758). In: Plano de Ação Nacional para Conservação das Tartarugas Marinhas. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, pt. 1, p. 30-33. (Série Espécies Ameaçadas, 25), 2011.

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

MCARTHUR, S. Infectious agents. IN: MCARTHUR, S.; WILKINSON, R.; MEYER, J. Medicina and Surgery of Tortoises and Turtles. Ames, IA: Blackwell publishing, p.31-34, 2004.

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

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

MEYLAN, A. B.; MEYLAN, P. A. Introduction to the evolution, life history, and biology of sea turtles. Research and management techniques for the conservation of sea turtles, v. 4, p. 3-5, 1999.

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

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.

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.

MORRISON, C. L.; IWANOWICZ, L.; WORK, T. M.; FAHSBENDER, E.; BREITBART, M.; ADAMS, C.; CORNMAN, R. S. Genomic evolution, recombination, and inter-strain diversity of chelonid alphaherpesvirus 5 from Florida and Hawaii green sea turtles with fibropapillomatosis. *PeerJ*, v. 6, p. e4386, 2018.

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.

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.

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

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* 29, 136–142, 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.

PELLET, P.; ROIZMANN, B. The family Herpesviridae: A brief introduction. In: KNIPE, D.; HOWLEY, P. M. (Ed). Fields Virology, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Publishers, v. 5, p. 2480-2499, 2007.

PRIOSTE, F E S. Detecção e quantificação de alguns elementos químicos inorgânicos em sangue e tecidos de tartarugas-verdes-*Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758)-da costa brasileira: possível correlação com a fibropapilomatose. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PRIOSTE, F. E. S.; ROSSI, S.A.; SOUZA, V. C. O.; QUEIROZ, M. R.; BARBOSA JR. F.; MATUSHIMA, E. R. Detecção das concentrações de elementos essenciais e metais encontrados no sangue de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) juvenis capturadas na costa brasileira (projeto em andamento). Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, v. 13, n. 1, p. 53-53, 2015.

QUACKENBUSCH, S.L.; BALAZS, G.H.; WORK, T.M.; CASEY, R.N.; ROVNAK, J.; CHAVES, A. *et al.* Three closely related herpesvirus are associated with Fibropapillomatosis in Marine Turtles. Virology, Philadelphia, v. 246, p. 392 – 399. 1998.

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.

ROBBEN, D. M.; PALANIAPPAN, P.; LOGANATHAN, A. L.; SUBBIAH, V. K. Increased Prevalence and New Evidence of Multi-Species Chelonid Herpesvirus 5 (ChHV5) Infection in the Sea Turtles of Mabul Island, Borneo. Animals, v. 13, n. 2, p. 290, 2023.

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. Fibropapilomatosis in Green turtles *Chelonia mydas* in Brasil: characteristics of tumors and virus. Diseases of Aquatic Organisms, Amelinghausen, v. 111, p. 207-217, 2014.

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

ROSSI, S. Análise da atividade de leucócitos e de bifenilaspolicloradas aplicada ao estudo da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) (Linnaeus 1758). Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada)-

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”; Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ROSSI, S.; ZWARG, T.; SANCHES, T. C.; CESAR, M. D. O.; WERNECK, M. R.; MATUSHIMA, E. R. Hematological profile of *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) according to the severity of fibropapillomatosis or its absence. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, p. 974-978, 2009.

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

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.

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.

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

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.

SOUZA, G. M. Abundância relativa sazonal e ameaças potenciais a juvenis de tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) em duas áreas do atlântico sul ocidental. 2014. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande.

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, p.22-25, 2016.

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

TAMAR 2023. Projeto TAMAR. <www.tamar.org.br>. Acesso em 12 jan. 2023

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

WILLIAMS, E.H.; BUNKLEY-WILLIAMS, L.; PETERS, E.C.; PINTO-RODRIGUEZ, B.; MATOS-MORALES, R.; MIGNUCCI-GIANNONI, A.A.; HALL, K.; RUEDA-ALMONACID, J.V.; SYBESMA, J.; DECALVENTI, I.B.; BOULON, R.R. An 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. Cancer in sea turtles. Hawaii Medical Journal, Honolulu, v.64, p. 23- 24, 2005.

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

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, v. 52, n. 6, p. 1195-1201, 2015.

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.; 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 (*Cheloniamydas*). Journal of General Virology, v.90, p. 1943-1950, 2009.

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.; WEATHERBY, T. M.; BALAZS, G. H.; ad, M. In vitro replication of chelonid herpesvirus 5 in organotypic skin cultures from Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). Journal of Virology, v. 91, n. 17, 2017.

WYNEKEN, J.; LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. The Biology of Sea Turtles Volume II. Boca Raton, FL: CRC Press, 2002. 472 p. v. 2.

WYNEKEN, J.; LOHMANN, K. J.; MUSICK, J. A. The Biology of Sea Turtles Volume III. Boca Raton, FL: CRC Press, 2013. 467 p. v. 3.

WYNEKEN, J. The Anatomy of Sea Turtles. Miami, FL: U.S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470, 2001. 172 p.

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

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.

