

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS ÁGRARIAS E ENGENHARIAS - CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

ADRIANO LIMA STELZER BINDACO

**IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA ESOFÁGICA E SUA PROVÁVEL
ASSOCIAÇÃO COM LESÕES CASEOSAS OBSTRUTIVAS EM TARTARUGAS-
VERDES (*Chelonia mydas*)**

ALEGRE – ES

2020

ADRIANO LIMA STELZER BINDACO

**IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA ESOFÁGICA E SUA PROVÁVEL
ASSOCIAÇÃO COM LESÕES CASEOSAS OBSTRUTIVAS EM TARTARUGAS-
VERDES (*Chelonia mydas*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Orientadora: Profa Dra Louisiane de Carvalho Nunes.

ALEGRE – ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

L732i Lima Stelzer Bindaco, Adriano, 1995-
Identificação da microbiota esofágica e sua provável
associação com lesões caseosas obstrutivas em tartarugas-verdes
(Chelonia mydas) / Adriano Lima Stelzer Bindaco. - 2020.
46 f. : il.

Orientadora: Louisiane de Carvalho Nunes.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias.

1. micro-organismo. 2. esôfago. 3. tartarugas marinhas. I. de
Carvalho Nunes, Louisiane. II. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. III. Título.

CDU: 619


ADRIANO LIMA STELZER BINDACO

**IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA ESOFÁGICA E SUA PROVÁVEL
ASSOCIAÇÃO COM LESÕES CASEOSAS OBSTRUTIVAS EM TARTARUGAS-
VERDES (*Chelonia mydas*)**

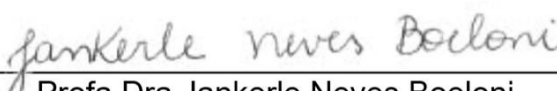
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Aprovado em 19 de fevereiro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA



Profa Dra Louisiiane de Carvalho Nunes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Profa Dra Jankerle Neves Boeloni
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof Dr Gabriel Domingos Carvalho
Instituto Federal do Espírito Santo

Dedico esse trabalho à minha mãe, Jusiana Cristina Baptista Lima.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter abençoado e dado forças para que eu concluísse essa caminhada.

À minha família que sempre esteve do meu lado, incentivando meus sonhos.

À minha orientadora Louisiane de Carvalho Nunes pelos sete anos de orientação e conhecimento, e por permitir que eu trabalhasse com o que eu amo.

À Jankerle Neves Boeloni por todo conhecimento e inspiração.

À Gabriela Fiuza Corato pelo apoio em mais uma etapa e por me ajudar a alcançar meus objetivos e sempre acreditar em mim.

À Fernanda Sampaio de Almeida, Gabriela Guizzardi, Lucas Batista Menassa e Maria Pontes de Souza por todos os anos de apoio, amizade e companheirismo.

Aos meus amigos, Felipe Martins Pastor, Izabelle Pereira de Lacerda, Leandro André Milholli e Marieta Couto Kuster, que também enfrentaram essa árdua jornada.

Aos meus amigos, Érica Machado Mendes de Andrade, Júlia Delpupo Coelho, Lhydyany Gonçalves Furtado de Melo, Lívia Martino Duarte, Lucas da Silva Schwambach, Renata de Paula Santos, Renzo Soares, Rudiery Lauson de Paula Reis, Stella Santos Mota, Suzana Donna Gaburo e Tábata Dornellas Guterra por terem me acolhido e mantido minha cabeça acima da água, acreditando em mim quando eu mesmo não acreditei.

À turma de Medicina Veterinária 2018/1(UFES) pelo carinho, valorização e respeito durante minha atuação como Professor Voluntário.

À todos os membros do Laboratório de Patologia Animal da UFES em especial, a Alana Camargo Poncio, Caio Alves Cardoso, César Oliveira Liesner, Júlio Francisco Valiati Marin, Marcos Paulo Brinati Miranda e Sara Oliveira Maia.

Ao meu mestre Antônio de Calais Júnior por todos os ensinamentos sobre tartarugas marinhas e por ter confiado em um calouro.

Ao IPCMar (base de Anchieta/ES) e ao professor Gabriel Domingos Carvalho (IFES) pela disponibilidade e parceria durante as coletas.

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

“sem seu passado,
você nunca poderia ter chegado —
tão maravilhosamente e brutalmente,
De propósito ou por alguma exótica e violenta coincidência
...aqui.”

Taylor Swift, 2017.

RESUMO

STELZER BINDACO, ADRIANO L. **Identificação da microbiota esofágica e sua provável associação com lesões caseosas obstrutivas em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*)**. 2020. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2020. A ocorrência de lesão caseosa no esôfago de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) da costa do Brasil tem sido descrita como de caráter obstrutivo e pode causar a morte dos animais. No entanto, sua etiologia ainda permanece pouco esclarecida. Objetivou-se caracterizar a microbiota esofágica das tartarugas-verdes (*C. mydas*) da costa brasileira e verificar sua possível participação na etiologia das lesões caseosas. Foram utilizados 42 animais, 33 vivos e saudáveis, e nove mortos naturalmente que apresentavam lesão esofágica, provenientes de Anchieta e Piúma, Espírito Santo, nos quais foram feitos testes microbiológicos e avaliação morfológica do esôfago. Foram isolados 14 agentes bacterianos diferentes nas amostras de animais saudáveis, com prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* (36,36%), *Staphylococcus aureus* (33,33%), *Aeromonas hydrophila* (27,27%) e *Vibrio alginolyticus* (24,24%). Nos animais mortos, foram isolados apenas três agentes distintos, *S. aureus*, *A. hydrophila* e *V. alginolyticus*. A avaliação morfológica revelou predominância da lesão em junção gastroesofágica, com distribuição multifocal a coalescente, intensidade discreta e ausência de obstrução. Observou-se ainda ulceração e exsudato caseoso, infiltrado inflamatório, ovos de parasitos e células gigantes do tipo corpo estranho, além de grumos bacterianos e de alterações glandulares, como necrose, adenite e fragmentos de parasitos adultos. Houve correlação positiva dos grumos bacterianos com cultivo microbiológico e negativa dos grumos bacterianos e cultivo microbiológico com parasitos. Assim, nota-se que a microbiota esofágica de *C. mydas* é constituída predominantemente por bactérias Gram-negativas como *P. aeruginosa*, *A. hydrophila* e *V. alginolyticus*, além de diversas enterobactérias e por Gram-positivas, como *S. aureus* e esses agentes estão envolvidos na etiologia da esofagite caseosa.

Palavras-chave: micro-organismo; esôfago; tartarugas marinhas

ABSTRACT

STELZER BINDACO, ADRIANO. **Identification of the esophageal microbiota and its probable association with obstructive caseous lesions in green turtles (*Chelonia mydas*)**. 2020. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2020. The occurrence of caseous lesion in the esophagus of green turtles (*Chelonia mydas*) from the coast of Brazil has been described as obstructive and can cause the death of animals. However, its etiology remains unclear. The aim of this study was to characterize the esophageal microbiota of green turtles (*C. mydas*) from the Brazilian coast and to verify their possible participation in the etiology of caseous lesions. Were used 42 animals, 33 alive and nine naturally dead who presented esophageal lesion, from Anchieta and Piúma, Espírito Santo, in which microbiological tests and morphological evaluation of the esophagus were performed. Were isolated 14 different bacterial agents from healthy animal samples, with prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* (36.36%), *Staphylococcus aureus* (33.33%), *Aeromonas hydrophila* (27.27%) and *Vibrio alginolyticus* (24.24%). In the dead animals, only three distinct agents, *S. aureus*, *A. hydrophila* and *V. alginolyticus*, were isolated. The morphological evaluation revealed a predominance of the lesion at the gastroesophageal junction, with multifocal to coalescent distribution, discrete intensity and absence of obstruction. Ulceration and caseous exudate, inflammatory infiltrate, parasitic eggs and foreign body giant cells were also observed, as well as bacterial lumps and glandular alterations, such as necrosis, adenitis and fragments of adult parasites. There was a positive correlation between bacterial lumps and microbiological test and a negative correlation between bacterial lumps and microbiological test with parasites. It is noted that the esophageal microbiota of *C. mydas* is predominantly composed of Gram-negative bacteria such as *P. aeruginosa*, *A. hydrophila* and *V. alginolyticus*, in addition to several enterobacteria and Gram-positive bacteria, such as *S. aureus* and these agents are involved in the etiology of caseous esophagitis.

Keywords: micro-organism; esophagus; sea turtles

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|------------|--|--------|
| Figura 1 - | A. Contenção física e coleta para exame microbiológico em tartaruga-verde (<i>Chelonia mydas</i>) por meio de <i>swab</i> estéril e abre boca adaptado. B. <i>Swab</i> devidamente acondicionado em meio Stuart para transporte e identificado..... | 26 |
| Figura 2 - | Variáveis utilizadas para avaliação microscópica dos esôfagos de tartarugas-verdes (<i>Chelonia mydas</i>) com esofagite caseosa da costa brasileira, entre janeiro e outubro de 2019..... | 28 |
| Figura 3 - | Fotomicrografia de esofagite caseosa em tartarugas-verdes (<i>Chelonia mydas</i>) encontradas naturalmente mortas na costa brasileira entre janeiro e outubro de 2019 com evidência do cáseo (círculo pontilhado e setas). A) distribuição focal e intensidade discreta (círculo pontilhado). B) distribuição multifocal e intensidade discreta (setas). C) distribuição multifocal a coalescente e intensidade moderada (setas). D) distribuição multifocal a coalescente com obstrução parcial discreta do lúmen (setas)..... | 32 |
| Figura 4 - | Fotomicrografia de esofagite ulcerativa caseosa em tartarugas-verdes (<i>Chelonia mydas</i>) encontradas mortas naturalmente na costa brasileira entre janeiro e outubro de 2019. A) Cáseo (asterisco) aderido à mucosa ulcerada (seta) HE. Barra = 100,00 µm. B) Infiltrado inflamatório mononuclear (asterisco) e ovos de parasito (setas) em lâmina própria HE. Barra = 100,00 µm. C) Ovos de parasitos em epitélio (seta) e em lâmina própria (asterisco) HE. Barra = 50,00 µm. D) Células multinucleadas do tipo corpo estranho em lâmina própria (seta) HE. Barra = 50,00 µm. E) Ovo de parasito (seta) circundado por células multinucleadas do tipo corpo estranho em lâmina própria (asterisco) HE. | |

Barra = 50,00 µm. F) Colônias bacterianas (seta) aderidas ao cáseo (asterisco) HE. 50,00 33
 µm.....

Figura 5 - Fotomicrografia de glândulas esofágicas tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) encontradas mortas naturalmente na costa brasileira entre janeiro e outubro de 2019. A) Glândula sem alterações com conteúdo mucoso evidenciado (asterisco) PAS. Barra = 100,00 µm. B) Infiltrado inflamatório mononuclear periglandular (seta) e no lúmen glandular e necrose (asterisco) HE. Barra = 100,00 µm. C) Conteúdo necrótico no lúmen glandular (setas) HE. Barra = 50,00 µm. D) Fragmento de parasito adulto (seta) associado à necrose glandular (asterisco) HE. Barra = 100,00 µm. E) Fragmento de parasito adulto (seta) associado à necrose glandular (asterisco), ulceração (cruz) e cáseo (triângulo) HE. Barra = 100,00 µm. F) Presença de fragmento de parasito adulto em área de ulceração (seta) com cáseo (asterisco) HE. Barra = 100,00 µm.....

LISTA DE TABELAS

| Tabela | | Página |
|---------------|--|---------------|
| Tabela 1 - | Agentes etiológicos isolados de infecções em tartarugas-verdes (<i>Chelonia mydas</i>) e seus respectivos processos patológicos, distribuídos por sistema. Fonte: Domiciano <i>et al.</i> , 2017; Gazebrook; Campbell, 1990; Gazebrook; Campbell; Thomas, 1993; Orós; Calabuig; Déniz, 2004; Orós <i>et al.</i> , 2005; Vega-Manriquez <i>et al.</i> , 2018..... | 20 |
| Tabela 2 - | Determinação da idade em tartarugas-verdes (<i>Chelonia mydas</i>) por meio da biometria macroscópica. Fonte: Hirth, 1997; Santos <i>et al.</i> , 2011..... | 25 |
| Tabela 3 - | Valores médios e desvio padrão do comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), largura curvilínea da carapaça (LCC) e peso de acordo com a idade das tartarugas-verdes (<i>Chelonia mydas</i>) de vida livre, vivas e encontradas mortas naturalmente na costa brasileira, no período de janeiro a outubro de 2019..... | 30 |
| Tabela 4 - | Bactérias isoladas da microbiota do esôfago de tartarugas-verdes (<i>Chelonia mydas</i>) de vida livre, bem como agentes isolados a partir de lesão caseosa esofágica em exemplares encontrados mortos naturalmente na costa brasileira, no período de janeiro a outubro de 2019..... | 31 |

SUMÁRIO

| | Página |
|---|---------------|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 2.1 Tartaruga-verde (<i>Chelonia mydas</i>)..... | 16 |
| 2.1.1 Principais agentes etiológicos diagnosticados em tartarugas- verdes (<i>Chelonia mydas</i>)..... | 17 |
| 2.1.1.1 Agentes virais..... | 17 |
| 2.1.1.2 Agentes bacterianos..... | 18 |
| 2.1.1.3 Agentes parasitários..... | 21 |
| 2.1.1.4 Agentes fúngicos..... | 22 |
| 2.1.2 Lesões esofágicas em tartarugas-verdes (<i>Chelonia mydas</i>)..... | 23 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 3.1 Exames microbiológicos..... | 26 |
| 3.2 Exames morfológicos macro e microscópicos..... | 27 |
| 4 RESULTADOS | 30 |
| 5 DISCUSSÃO | 35 |
| 6 CONCLUSÃO | 41 |
| 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 42 |

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) é considerada pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) como uma espécie “Vulnerável” (VU) no Brasil e “Em Perigo” (EN) em escala global (IUCN, 2020). Apesar de a ação antrópica ser a responsável pelo elevado índice de mortalidade de *C. mydas* na costa brasileira (GAGLIARDI; LOPES; SERAFINI, 2018), doenças virais, parasitárias, fúngicas e bacterianas, também representam importantes causas de mortes desses indivíduos (DOMINICANO *et al.*, 2017; GAZEBROOK; CAMPBELL, 1990).

Diversos estudos sugerem a participação da microbiota em lesões inflamatórias em diversos tecidos de tartarugas-verdes (ORÓS; CALABUIG; DÉNIZ, 2004). Em répteis a infecção bacteriana pode desencadear inflamação do tipo caseosa, caracterizada macroscopicamente por material branco-amarelado e friável, e microscopicamente, pela exsudação de heterófilos degranulados e degenerados (MONTALI, 1988).

Nesse contexto, a ocorrência comum de esofagite caseosa em tartarugas-verdes é relatada, associada com parasitos trematodas e cocos Gram-positivos (CALAIS JÚNIOR, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2017; SANTORO *et al.*, 2007). Santoro *et al.* (2007) propuseram que as bactérias possuem provável origem da flora esofágica, enquanto Calais Júnior (2015) sugeriu que as mesmas sejam mais relevantes no desenvolvimento da resposta inflamatória e formação do cáseo, no entanto, não foi informado o gênero e/ou espécie bacteriana encontrados nas lesões.

Embora não se tenha completamente estabelecido a etiopatogenia da esofagite caseosa, Calais Júnior (2015) verificou alta prevalência (82,22%) da enfermidade nos animais avaliados na costa capixaba. Este mesmo autor observou que o exsudato caseoso gerado pelo processo inflamatório, por vezes pode obstruir totalmente o lúmen esofágico. Histologicamente há ulceração da mucosa associado ao acúmulo de heterófilos (cáseo), adenite parasitária, inflamação em lâmina própria, colônias de bactérias Gram-positivas, além de tecido conjuntivo fibroso (RIBEIRO *et al.*, 2017).

Diante desse cenário, observa-se que a esofagite caseosa pode se tornar obstrutiva e ocasionar diminuição da ingestão de alimentos, caquexia e morte dos

animais, o que pode contribuir para a redução da população da espécie. Além disto, na literatura consultada, não existem dados sobre a microbiota do esôfago de *C. mydas*, bem como quais são os agentes bacterianos encontrados nos processos inflamatórios do esôfago. Assim, objetivou-se identificar a população bacteriana do esôfago de *C. mydas* e também comprovar o seu provável envolvimento na etiologia das esofagites caseosas. Também preconizou-se realizar avaliação morfológica macro e microscópica dos esôfagos acometidos, a fim de se contribuir para o melhor entendimento da etiologia e fisiopatogenia da enfermidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tartaruga-verde (*Chelonia mydas*)

A tartaruga-verde ou aruanã (*Chelonia mydas*) habita águas tropicais e subtropicais dos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico. É a espécie de tartaruga marinha com maior população nos mares do Brasil. Seu ciclo de vida é longo e complexo. Os filhotes nascem com 25 g e após uma semana, tornam-se juvenis, e permanecem nesta fase até a carapaça alcançar 40 cm de comprimento, daí em diante passam a ser subadultos. A fase adulta é alcançada após a maturidade sexual, que ocorre entre 26 e 46 anos, quando a carapaça mede em torno de 70 a 100 cm de comprimento (HIRTH, 1997; SANTOS *et al.*, 2011).

O acasalamento ocorre em alto mar e as fêmeas retornam à praia do seu nascimento para ovoposição. Depositam em média 122 a 125 ovos, durante o período de dezembro a junho no Brasil. Utilizam como áreas de desova as ilhas oceânicas brasileiras, como a Ilha da Trindade, a Reserva Biológica do Atol das Rocas e o Arquipélago de Fernando de Noronha, localizadas nos estados do Espírito Santo (ES), Rio Grande do Norte (RN) e Pernambuco (PE), respectivamente. A Ilha de Trindade – ES se destaca por abrigar o maior número de desovas de *C. mydas*, com o registro de 3.500 ninhos entre os anos de 2009 a 2010 (PROJETO TAMAR, 2020; SANTOS *et al.*, 2011).

Quando filhote a tartaruga-verde é onívora com tendência carnívora e adquire hábito alimentar exclusivamente herbívoro a partir da fase juvenil. Alimentam-se principalmente de gramíneas marinhas e macroalgas e, devido a sua dieta, passam a maior parte do seu ciclo de vida em baías rasas e áreas próximas a costa na qual a vegetação marinha é abundante, tornando-se a espécie de tartaruga marinha a apresentar hábitos mais costeiros (BJORNDAL, 1985; ROMANINI, 2014).

Morfologicamente *C. mydas* possui a cabeça pequena e arredondada, com bico ligeiramente serrilhado. O plastrão é de coloração branca em filhotes e amarelada nos adultos, e na extremidade das longas nadadeiras há a presença de uma unha. Sua carapaça é larga, ovalada e coberta por placas justapostas de queratina (cinco centrais e quatro pares laterais), de coloração castanha esverdeada ou acinzentada, que em filhotes varia de marrom a negro. As placas também estão

presentes na região pré-frontal (um par) e na região pós-orbital (dois pares) (PRITCHARD; MORTIMER, 1999).

Assim como todas as demais espécies de tartarugas marinhas, *C. mydas* é considerada pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), uma espécie ameaçada de extinção em escala mundial, sendo classificada como “vulnerável” (VU) no Brasil e no âmbito internacional como “em perigo” (EN) (IUCN, 2020).

Diversas causas levam à redução da população desses animais nos mares do Brasil. A principal é a ação antrópica, que causa a perda de áreas de desova e alimentação, mortalidade (interação com a pesca), além de gerar carga de resíduos não biodegradáveis e poluentes aos oceanos (SANTOS *et al.*, 2011). Por outro lado, agentes virais, bacterianos, fúngicos e/ou parasitários podem causar infecções em diversos tecidos e órgãos e ocasionar a morte das tartarugas-verdes (BAPTISTOTTE, 2014; DOMICIANO *et al.*, 2017).

2.1.1 Principais agentes etiológicos diagnosticados em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*)

2.1.1.1 Agentes virais

Em *Chelonia mydas* a Família Herpesviridae compreende os principais agentes virais de importância para espécie. O herpesvírus quelônio 5 (ChHV-5) causa o desenvolvimento de neoplasias cutâneas e/ou viscerais benignas em tartarugas-verdes. Representa ameaça crescente para a espécie, com o vírus associado a fatores ambientais como poluição do ecossistema marinho e temperatura da água (MATUSHIMA *et al.*, 2001; MONEZI *et al.*, 2016).

Os tumores são mais comuns em nadadeiras, pescoço, cabeça, região inguinal e axilar, e base da cauda, e afetam a locomoção, alimentação, respiração, visão, e a condição geral de saúde das tartarugas, tornando-as propensas a doenças bacterianas ou parasitárias secundárias, predação e até mesmo a morte (MATUSHIMA *et al.*, 2001). Histologicamente os neoplasmas são classificados de

acordo com o tipo de proliferação tecidual em papiloma cutâneo, quando há apenas proliferação de tecido epitelial; fibroma, quando há proliferação restrita ao tecido conjuntivo e fibropapiloma, quando se observa a proliferação de ambos os tecidos (HERBST, 1994).

Por outro lado, o herpesvírus quelônio 1 (ChHV-1) está relacionado a dermatite necrótica (*Gray patch disease*), principalmente em filhotes. Enquanto que o herpesvírus quelônio 6 (ChHV-6) desencadeia lesões no trato respiratório como traqueíte necrótica e pneumonia severa (DOMICIANO *et al.*, 2017; GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990).

2.1.1.2 Agentes bacterianos

O tegumento e o sistema imune eficiente das tartarugas marinhas reduzem a oportunidade de micro-organismos penetrarem e colonizarem os tecidos do organismo. Entretanto, poluição e alteração da temperatura e salinidade da água, bem como traumatismos e/ou aspiração d'água podem predispor a infecção por bactérias, oriundas da microbiota e/ou do ambiente (BAPTISTOTTE, 2014; DOMINICANO *et al.*, 2017).

Todo réptil apresenta microbiota oportunista e patogênica. Santoro *et al.* (2006) identificaram 10 gêneros de bactérias Gram-negativas (*Aeromonas*, *Bordetella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Vibrio*) e três de Gram-positivas (*Bacillus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*) que compõem a flora nasal e cloacal de fêmeas de *Chelonia mydas* em nidificação. Estes mesmos autores notaram a maior frequência de *K. pneumonia* e seguida de *S. intermedius*, *K. oxytoca*, *S. aureus*, *E. agglomerans* e *P. mirabilis*. Na mesma linha, Reis *et al.* (2010) evidenciaram a alta prevalência de *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp. em regiões oral, nasal e de ferimentos, em tartarugas-verdes juvenis.

No caso das tartarugas marinhas, o ambiente aquático também é considerado importante fonte de contaminação, devido à ampla distribuição de *Vibrio* spp. *Aeromonas* spp. nesse ecossistema (PEIXOTO, *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2001).

Em tartarugas-verdes cativas é comum o desenvolvimento de doenças bacterianas secundárias associadas à imunossupressão (estresse) e trauma causados pelo cativo. Enquanto que, nos filhotes, o sistema imunológico ainda em desenvolvimento, torna as infecções mais frequentes e fatais (GAZEBROOK; CAMPBELL; THOMAS 1993; VEGA-MANRIQUEZ *et al.*, 2018).

Os patógenos bacterianos isolados a partir de lesões de *C. mydas* (cativas e de vida livre) pertencem aos gêneros *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Arizona*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shewanella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Vibrio* (DOMICIANO *et al.*, 2017; GAZEBROOK; CAMPBELL, 1990; ORÓS; CALABUIG; DÉNIZ, 2004).

C. mydas que vivem em cativeiro são comumente acometidas por infecções causadas principalmente por *Pseudomonas sp.*, *V. alginolyticus*, *A. hydrophila*, *Flavobacterium sp.*, *S. lentus*, *C. braaky* e *E. faecium*. Esses patógenos estão relacionados com estomatites, dermatites, rinites e broncopneumonias, lesões que podem ocorrer de forma concomitante nos animais (GAZEBROOK; CAMPBELL; THOMAS, 1993; VEGA-MANRIQUEZ *et al.*, 2018).

Os micro-organismos relatados em enfermidades bacterianas em tartarugas-verdes, bem como as lesões de quais foram isolados são exibidos na tabela a seguir (Tabela1).

Tabela 1. Agentes etiológicos isolados de infecções em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) e seus respectivos processos patológicos, distribuídos por sistema. Fonte: Domiciano *et al.*, 2017; Gazebrook; Campbell, 1990; Gazebrook; Campbell; Thomas, 1993; Orós; Calabuig; Déniz, 2004; Orós *et al.*, 2005; Vega-Manriquez *et al.*, 2018.

| Sistema/Local | Processo patológico | Agentes bacterianos associados |
|---------------|---|--|
| Tegumento | Dermatite ulcerativa traumática* | <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. fluorescense</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Vibrio alginolyticus</i> |
| Osteomuscular | Osteomilete | <i>Flavobacterium</i> sp. e <i>V. alginolyticus</i> |
| Endócrino | Adenite abscedativa (glândula de sal) | <i>P. aeruginosa</i> |
| Nervoso | Meningoencefalite granulomatosa | <i>Corynebacterium</i> spp. |
| Respiratório | Broncopneumonia | <i>A. hydrophila</i> , <i>Arizona hinshaln</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> e <i>V. alginolyticus</i> |
| | Pneumonia granulomatosa | <i>Mycobacterium</i> sp. |
| | Rinite caseosa obstrutiva | <i>A. hydrophila</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> e <i>P. fluorescens</i> e <i>V. alginolyticus</i> |
| | Estomatite ulcerativa caseosa | <i>A. hydrophila</i> , <i>Citrobacter braaky</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>S. lentus</i> , <i>Streptococcus</i> spp. e <i>V. alginolyticus</i> |
| | Glossite ulcerativa caseosa | <i>Achromobacter</i> sp. e <i>Burkholderia capacia</i> |
| | Esófagite ulcerativa fibrinosa/fibrinonecrótica traumática* | <i>A. hydrophila</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>V. alginolyticus</i> |
| | Gastrite fibrinosa/necropulurenta | <i>Proteus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>V. alginolyticus</i> |
| Digestório | Enterite catarral/fibrinonecrótica/necropulurenta | <i>Bacillus</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Pasteurella</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>S. marcescens</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp. e <i>V. alginolyticus</i> |
| | Abscessos e granulomas intestinais | <i>Bacillus</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Pasteurella</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp. e <i>V. alginolyticus</i> |
| | Serosite fibrinosa | <i>Bacillus</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Pasteurella</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>S. marcescens</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp. e <i>V. alginolyticus</i> |
| Fígado | Hepatite granulomatosa necrotizante | <i>A. hydrophila</i> , <i>Citrobacter</i> sp., <i>Proteus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>V. alginolyticus</i> |
| | Hepatite linfocitocítica | <i>Salmonella enteritidis</i> |
| Ocular | Blefarite ulcerativa caseosa | <i>Achromobacter</i> sp., <i>B. capacia</i> , <i>Flavobacterium</i> sp. e <i>P. aeruginosa</i> |
| Celoma | Celomite | <i>Citrobacter amalomaticos</i> e <i>C. freundii</i> |

*Infecções associadas a trauma tecidual prévio

2.1.1.3 Agentes parasitários

As tartarugas-verdes são comumente infectadas por endoparasitos e são consideradas a espécie de tartaruga marinha com a maior abundância média e riqueza de helmintos. Estudos comprovaram a alta frequência de infecção em *Chelonia mydas*, com mais de 50% dos indivíduos com carga parasitária, a maioria constituída por mais de um tipo de parasito (BINOTTI *et al.*, 2016).

A população parasitária é influenciada pela dieta, habitat, migração, densidade populacional e imunidade das tartarugas-verdes. A alimentação é um dos meios mais prováveis de infecção. Acredita-se que os hospedeiros intermediários dos parasitos utilizam as algas marinhas como possível substrato para o seu desenvolvimento. Além disso, durante a transição de filhote para juvenil, *C. mydas* adquire hábito alimentar herbívoro, e passa a habitar regiões mais costeiras. Nesse contexto, essas alterações podem levar a imunossupressão, ao mesmo tempo, que os animais entram em contato com novas formas infectantes, até então desconhecidas (SANTORO; MORALES; RODRÍGUES-ORTIZ, 2006; WERNECK, 2011).

Os parasitos consomem sangue, tecidos sólidos e/ou nutrientes, e causam necrose tecidual, obstrução do trato gastrointestinal, produção de toxinas e reações inflamatórias. A constituição da carga parasitária pode ser influenciada pela imunidade, dieta e habitat do hospedeiro, densidade populacional, e processos migratórios. (KLINGENBERG, 2007).

Aproximadamente 30 espécies de trematodas foram descritos em tartarugas-verdes. As espécies predominantes pertencem a Classe Trematoda, com destaque para *Cricocephalus albus* (estômago e intestino delgado), *Metacetabulum invaginum* (estômago, intestino delgado e intestino grosso), *Neoctangium travassosi* (intestino delgado e intestino grosso), *Pronocephalus obliquus* e *Pleurogonius longiusculus*, que parasitam todas as porções do trato gastrointestinais já citadas, além do fígado (BINOTTI *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2017; WERNECK, 2011).

Os agentes parasitários estão frequentemente associados a processos inflamatórios. Ovos e parasitos adultos da família Spirorchiidae são causas de

lesões cardiovasculares em tartarugas-verdes. O parasito fixa-se no endocárdio e/ou permanece livre dentro das câmaras e vasos cardíacos, e pode disseminar para vários outros órgãos. A espécie mais comum é o *Learedius learedi*, que possui predileção por vasos sanguíneos, levando a inflamação granulomatosa na parede vascular, com relatos de lesões em estômago, coração, fígado, baço, pulmões, rins e mesentério (WERNECK *et al.*, 2006).

Rameshwarotrema uterocrescens, identificado em glândulas esofágicas, está relacionado com inflamação caseosa e ulcerativa do esôfago de tartarugas-verdes (RIBEIRO *et al.*, 2017; SANTORO *et al.*, 2007). Ao passo que *Rhytidoides similis* leva a hiperplasia de mucosa e a inflamação linfocítica em bexiga (DOMINICANO *et al.*, 2017).

Em seu estudo sobre a hemintofauna de *C. mydas*, Binotti *et al.* (2016) descreveu a primeira ocorrência de *Deuterobaris intestinalis* e *Enodiotrema reductum* em intestinos, e *R. similis* em vesícula urinária de tartarugas verdes da costa do Brasil. O mesmo autor também observou a nível histológico presença de ovos íntegros e degenerados em diversos órgãos como encéfalo, pulmões, pâncreas, fígado, baço e rins, associados a células gigantes do tipo corpo estranho. As formas adultas dos parasitos foram encontradas em órgãos cavitários, como estômago, intestinos delgado e grosso, vesícula urinária e nas câmaras cardíacas.

Apesar da menor frequência, nematóides podem parasitar tartarugas-verdes. Espécies como *Anisakis simplex* e *A. typica* se alojam no estômago levando à gastrite ulcerativa hemorrágica, além de serosite. O parasito *Sulcascaris sulcata* também pode desencadear úlceras gástricas, gastrite fibrinopurulenta, gastrite crônica e/ou serosite (BURKE; RODGERS, 1982).

2.1.1.4 Agentes fúngicos

Mesmo incomum em tartarugas-verdes, as infecções fúngicas também foram relatadas, principalmente secundárias a infecções bacterianas ou relacionadas à imunossupressão, causando micose sistêmica, enfermidades respiratórias e gastrointestinais (GAZEBROOK; CAMPBELL; THOMAS 1993).

Os principais relatos são de traqueíte granulomatosa causada por *Cladosporium* spp., *Cochliobolus* spp., *Ochroconis* spp. e *Veronaea botryosa* (DONNELLY *et al.*, 2015). Além de pneumonia granulomatosa associada à *Paecilomyces* spp., e associação com parasitos em casos de hepatite granulomatosa necrótica.

2.1.2 Lesões caseosas esofágicas em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*)

O esôfago de *Chelonia mydas* é caracterizado por papilas cônicas e pontiagudas, orientadas casualmente na direção do estômago. Essas estruturas facilitam a deglutição e retém o alimento, o que impede sua regurgitação frente a mudanças de pressão (causadas pelo ato de mergulhar), e também durante a contração da musculatura esofágica para expulsão do excesso de água (CALAIS JÚNIOR; DAVID; NUNES, 2015; MAGALHÃES *et al.*, 2010).

É dividido em quatro regiões, no sentido craniocaudal: regiões proximal (P), medial (M), distal (D), e junção gastroesofágica (JGE), esta última que se difere das demais regiões por apresentar pregas reticulares longitudinais e glândulas produtoras de muco. Após a JGE, o lúmen esofágico sofre intenso estreitamento e forma o esfíncter gástrico, que delimita a transição para região inicial (cárdica) do estômago (CALAIS JÚNIOR; DAVID; NUNES, 2015).

Doenças que comprometam o funcionamento do esôfago podem levar a morte da tartaruga-verde, tendo em vista a importância do órgão na nutrição do animal. A esofagite ulcerativa fibrinosa/fibrinonecrotica em *C. mydas* é causada por perfuração do esôfago e infecção bacteriana secundária por *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. e/ou *Vibrio alginolyticus*. Artefatos da atividade pesqueira anzol e/ou nylon são os principais causadores de lesão traumática em esôfago (ORÓS *et al.*, 2005). Na mesma linha, resíduos antrópicos também podem levar a ulceração e necrose de mucosa e obstrução do lúmen esofágico (AWABDI; RODRIGUES; BENEDITTO, 2013).

A inflamação caseosa do esôfago é relatada em tartarugas-verdes, principalmente da costa brasileira. Ribeiro *et al.* (2017) e Santoro *et al.* (2007) denominaram a enfermidade como gastroesofagite caseosa ulcerativa com etiologia

pelo parasito *Rameshwarotrema uterocrescens*, que leva a adenite com posterior necrose e infecção secundária por cocos Gram-positivos.

Calais Júnior (2015) verificou a ocorrência de lesões caseosas em esôfago de 37 exemplares de *C. mydas* no litoral do Espírito Santo, com oito animais apresentando obstrução total do lúmen esofágico pelo cáseo. Este autor associou a doença a quatro tipos diferentes de trematodas, entre eles *R. uterocrescens*, e bactérias Gram-positivas, no entanto constatou a presença de parasitos sem a ocorrência da lesão. O estudo ainda observou maior associação das bactérias com a formação do exsudato caseoso e sugeriu que esses micro-organismos tenham um papel importante no desenvolvimento do cáseo e da obstrução.

Ochoa (2017) também ponderou a doença e descreveu a alteração como gastroesofagite severa necrotizante parasitária e bacteriana, além de relatar outras lesões em esôfagos de tartarugas-verdes como vasculite granulomatosa parasitária e esofagite supurativa ulcerativa (sem etiologia).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas tartarugas vivas, de vida livre, para obtenção de amostras microbiológicas, bem como exemplares encontrados mortos naturalmente que foram submetidos à necropsia e exames morfológicos. Os animais vivos foram capturados pela equipe do Instituto de Pesquisa e Conservação Marinha (IPCmar), base de Anchieta, Espírito Santo. Por sua vez, os cadáveres foram provenientes do projeto de pesquisa “Ecologia de tartarugas marinhas nas ilhas costeiras do município de Piúma/ES” (protocolo SISBIO nº43135-3), coordenado pelo Professor e Doutor Thiago Holanda Basilio, e vinculado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (IFES), campus Piúma, bem como, aqueles recolhidos pela equipe de monitoramento de praias do IPCmar.

Este protocolo de pesquisa possui autorização para atividades com finalidade científica SISBIO nº 39329-4 e aprovação pelo Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo, sob protocolos 01/2018 e 16/2018.

De cada animal foi obtido peso (Kg), comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), largura curvilínea da carapaça (LCC) e local de captura por sistema de posicionamento global (GSP). A idade foi estabelecida pelos parâmetros exibidos na Tabela 2. Nos animais mortos o sexo foi determinado também pela observação das gônadas.

Tabela 2. Determinação da idade em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) por meio da biometria macroscópica. Fonte: Hirth, 1997; Santos *et al.*, 2011.

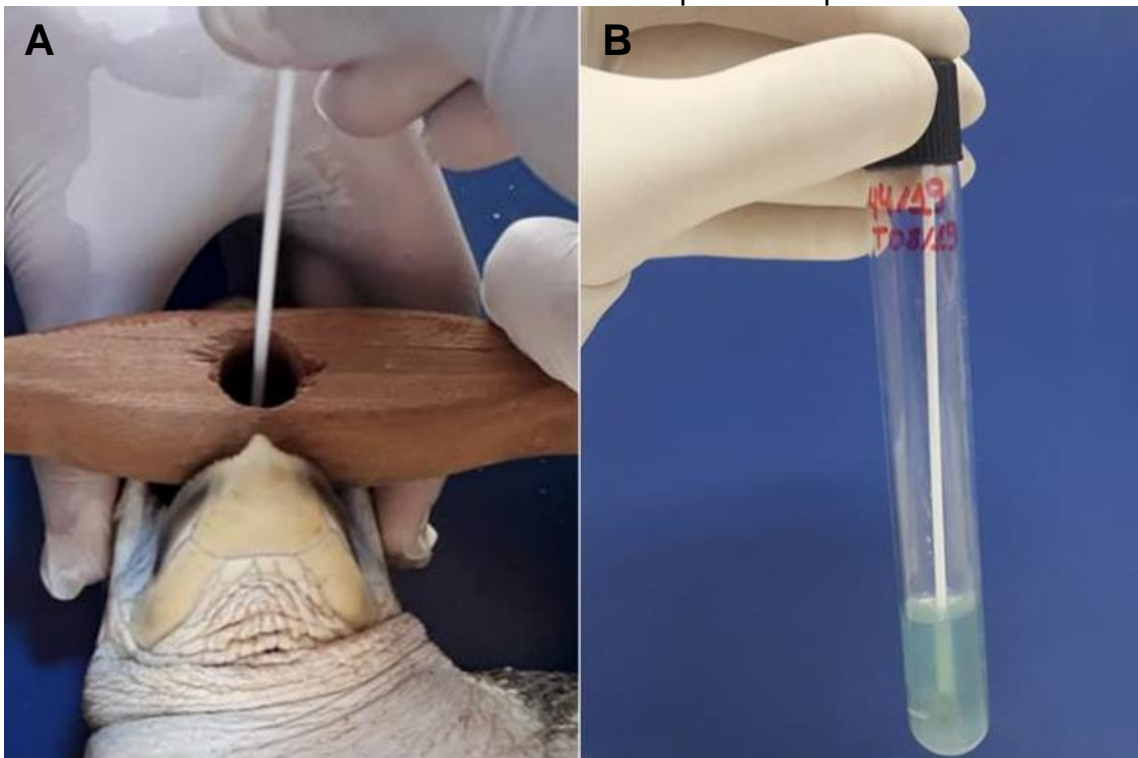
| Idade | Determinação |
|-----------|---|
| Filhote | Até uma semana de vida |
| Juvenil | CCC até 40 cm |
| Subadulto | CCC maior que 40 cm |
| Adulto | Maturidade sexual (CCC entre 70 e 100 cm) |

^{CCC} Comprimento Curvilíneo da Carapaça.

3.1 Exames microbiológicos

Nos animais vivos, a coleta de material biológico foi feita mediante a contenção física dos animais, seguida da utilização de abre boca adaptado do modelo para pequenos ruminantes. Posteriormente, foi introduzido *swab* estéril (15 cm) no esôfago dos animais e realizada a esfoliação de toda a mucosa do órgão (Figura 1.A). Após serem retirados, os *swabs* foram acondicionados individualmente em meio Stuart para transporte, e encaminhados sob refrigeração para o Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (Figura 1.B).

Figura 1: A. Contenção física e coleta para exame microbiológico em tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) por meio de *swab* estéril e abre boca adaptado. B. *Swab* devidamente acondicionado em meio Stuart para transporte e identificado



Fonte: o autor

Nos animais mortos, durante a necropsia foi avaliada a mucosa do esôfago e observada presença de exsudato caseoso e a região acometida. Em seguida foi introduzido *swab* estéril da área lesionada, que imediatamente foi armazenado em meio *Stuart* para transporte e encaminhados sob refrigeração para o laboratório anteriormente citado.

Todos os *swabs* foram inoculados em meios de culturas seletivos para bactérias Gram-negativas, como Ágar MacConckey (Enterobactérias), Ágar seletivo para *Pseudomonas Aeromonas* – Ágar GSP (*Aeromonas* spp./*Pseudomonas* spp.) e Ágar de tiosulfato, citrato, bile e sacarose – Ágar TCSB (*Vibrio* spp.). Para identificação de bactérias Gram-positivas foi utilizado o Ágar BHI (*Brain Heart Infusion*). Todos os meios foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 a 48 horas.

As colônias com crescimento em meio BHI e nos ágars seletivos (GSP, MacConckey e TCBS), foram submetidas à coloração de Gram para classificação em positivas ou negativas.

Para as bactérias Gram-positivas foram realizados testes bioquímicos de acordo com Anvisa (2008) para comprovação do gênero e consequente espécies dos agentes.

Para as bactérias Gram-negativas foram avaliadas ainda coloração e textura das colônias e, posteriormente, foram realizados testes bioquímicos segundo Anvisa (2004), para identificação de espécies de *Aeromonas*, *Pseudomonas* e enterobactérias e de acordo com Ministério da Saúde (2010) para detecção de espécimes de *Vibrio*.

3.2 Exames morfológicos macro e microscópicos

Os cadáveres foram necropsiados no IFES-Piúma ou no Setor de Patologia Animal do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (HOVET-CCAUE-UFES). A necropsia foi de acordo com técnica estabelecida por Wolke e George (1981), com exame externo completo e análise de todos os órgãos.

Durante o exame necroscópico, os esôfagos que apresentavam exsudato caseoso aderido à mucosa foram coletados individualmente e fixados em formalina a 10%, e encaminhados para o Laboratório de Patologia Animal do HOVET-CCAUE-UFES, para avaliação macro e microscópica.

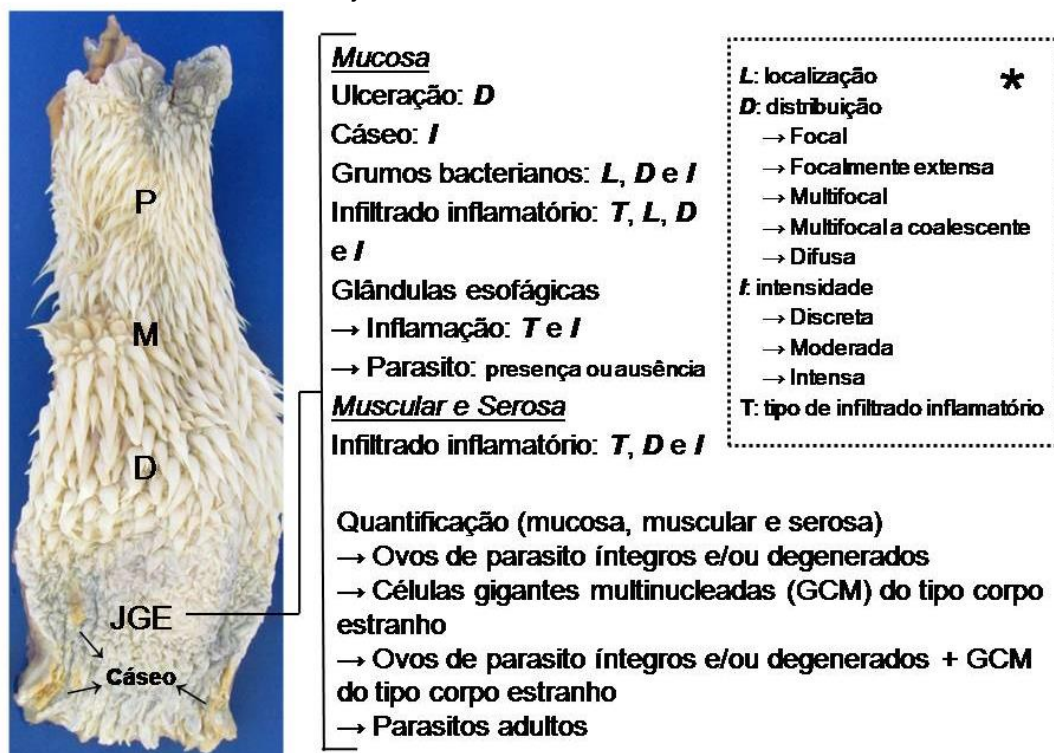
Inicialmente cada órgão foi fotodocumentado, medido (cm), e nas áreas lesionadas foram descritas a localização, distribuição, intensidade e tamanho do

cáseo, além do *status* de obstrução do lúmen esofágico de acordo com Calais Júnior (2015).

Foram consideradas quatro regiões do esôfago: região proximal (P), região medial (M), região distal (D), e junção gastroesofágica (JGE). Os tecidos sofreram processamento histológico de rotina; desidratação (concentração crescente de etanol de 70° GL a 100° GL), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, para enfim serem cortados em micrótomo rotativo manual em secções de 3 µm de espessura.

As lâminas resultantes foram submetidas à coloração por Hematoxilina e Eosina (HE) e amostras da JGE também foram coradas pela técnica de Ácido Periódico-Schiff (PAS). Em seguida as amostras foram analisadas em microscópio óptico de luz. As variáveis avaliadas na descrição microscópica são exibidas na Figura 2.

Figura 2. Variáveis utilizadas para avaliação microscópica dos esôfagos de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) com esofagite caseosa da costa brasileira, entre janeiro e outubro de 2019.



Fonte: o autor

* As variáveis de localização, distribuição, intensidade e tipo de infiltrado inflamatório foram feitas segundo Ackermann (2013)

Os dados foram avaliados por estatística descritiva, baseada em percentuais e, para as variáveis cáseo, grumos bacterianos, parasitos e cultivo microbiológico utilizou-se o teste de correlação de Spearman a nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

Foram utilizados 42 espécimes de *Chelonia mydas*, sendo 33 vivas, de vida livre, obtidas em 84,85% (28/33) das capturas na Praia do Além (20°48'03.3"S 40°34'57.0"W) e em 15,15% (5/33) na Praia Marvila (20°48'47.4"S 40°39'58.8"W), ambas no município de Anchieta, ES e nove animais mortos, 77,78% (7/9) e 22,22% (2/9) provenientes dos municípios de Piúma (20°50'31.9"S 40°43'46.0"W) e Anchieta n(20°48'03.3"S 40°34'57.0"W), respectivamente.

Os dados sobre comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), largura curvilínea da carapaça (LCC) e peso dos 42 animais avaliados estão dispostos na Tabela 3. Sobre a idade dos animais, 83,33% (35/42) foram juvenis, enquanto que 16,67% (7/42) subadultos. Dentre os animais mortos, nos quais foi possível fazer a diferenciação sexual, foram analisados 77,78% (7/9) indivíduos machos e 22,22% (2/9) fêmeas.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão do comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), largura curvilínea da carapaça (LCC) e peso de acordo com a idade das tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) de vida livre, vivas e encontradas mortas naturalmente na costa brasileira, no período de janeiro a outubro de 2019.

| C. mydas | N | Idade | CCC (cm) | LCC (cm) | Peso (Kg) |
|-----------------|----------|--------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Vivas | 26/42 | Juvenil | 34,89 (± 2,63) | 32,37 (± 3,10) | 4,76 (± 1,07) |
| | 7/42 | Subadulto | 43,04 (± 4,22) | 39,97 (± 4,68) | 9,19 (± 3,00) |
| Mortas | 9/42 | Juvenil | 34,39 (± 1,82) | 31,73 (± 2,13) | 4,59 (± 1,06) |

^N número de exemplares de *C. mydas* em relação ao total de animais

O cultivo microbiológico evidenciou os agentes descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Bactérias isoladas da microbiota do esôfago de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) de vida livre, bem como agentes isolados a partir de lesão caseosa esofágica em exemplares encontrados mortos naturalmente na costa brasileira, no período de janeiro a outubro de 2019.

| Bactérias isoladas | Família e/ou Gênero | Espécie | <i>C. mydas</i> vivas | | <i>C. mydas</i> mortas | |
|-----------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------|-------|------------------------|-------|
| | | | Mucosa esofágica* | %* | Lesão caseosa* | %+ |
| Gram-negativas | <i>Aeromonas</i> | <i>A. hydrophila</i> | 9/33 | 27,27 | 1/4 | 25,00 |
| | | <i>Citrobacter freundii</i> | 2/33 | 6,06 | 0/4 | 00,00 |
| | Enterobacteriaceae | <i>Enterobacter cloacae</i> | 4/33 | 12,12 | 0/4 | 00,00 |
| | | <i>Escheria coli</i> | 6/33 | 18,18 | 0/4 | 00,00 |
| | <i>Pseudomonas</i> | <i>Proteus vulgaris</i> | 3/33 | 9,09 | 0/4 | 00,00 |
| | | <i>P. aeruginosa</i> | 12/33 | 36,36 | 0/4 | 00,00 |
| | <i>Vibrio</i> | <i>V. alginolyticus</i> | 8/33 | 24,24 | 1/4 | 25,00 |
| | | <i>V. fluvialis</i> | 4/33 | 12,12 | 0/4 | 00,00 |
| | | <i>V. metschnikovii</i> | 3/33 | 9,09 | 0/4 | 00,00 |
| | Gram-positivas | <i>Staphylococcus</i> | <i>V. parahaemolyticus</i> | 5/33 | 15,15 | 0/4 |
| <i>S. aureus</i> | | | 11/33 | 33,33 | 2/4 | 50,00 |
| <i>S. epidermidis</i> | | 3/33 | 9,09 | 0/4 | 00,00 | |
| <i>Bacillus</i> | | <i>S. intermedius</i> | 2/33 | 6,06 | 0/4 | 00,00 |
| | | <i>Bacillus spp.</i> | 2/33 | 6,06 | 0/4 | 00,00 |

Mucosa esofágica número de bactérias isoladas em relação ao total de mucosas esofágicas esfoliadas em animais vivos

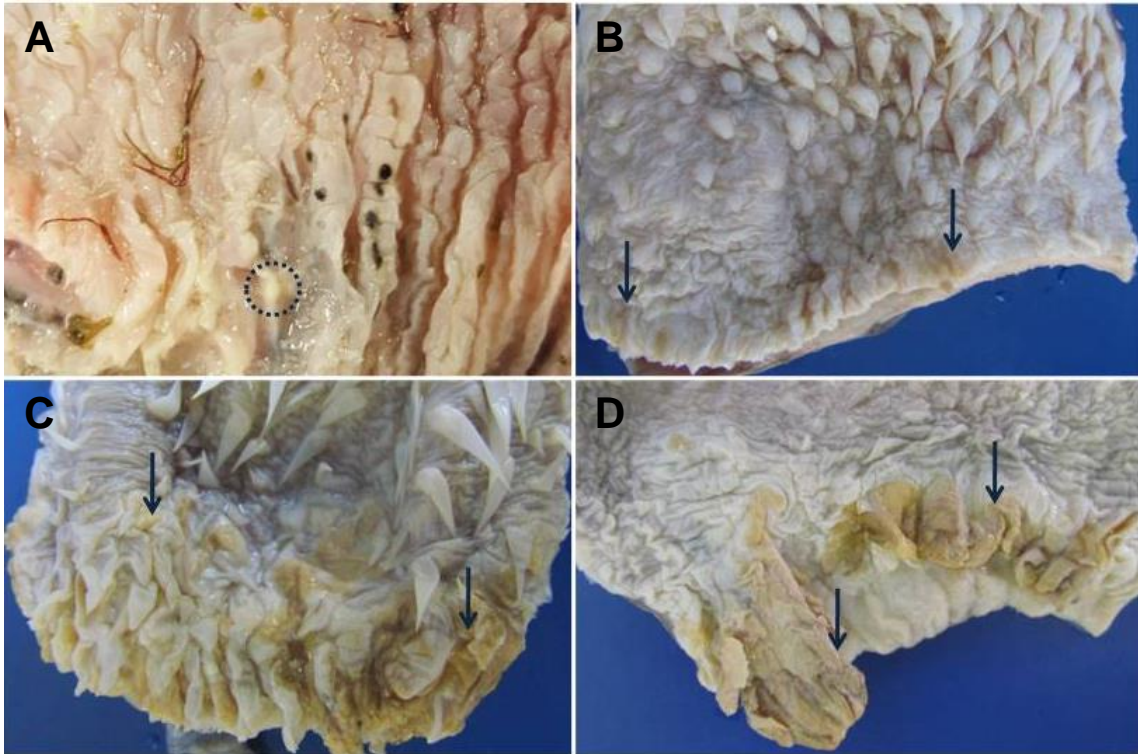
%* porcentagem de bactérias isoladas em relação ao total de mucosas esofágicas esfoliadas em animais vivos

Lesão caseosa número de bactérias isoladas em relação ao total de lesões caseosas esfoliadas em animais mortos.

%+ número de bactérias isoladas em relação ao total de lesões caseosas esfoliadas em animais mortos.

Dos nove animais mortos avaliados macroscopicamente com esofagite caseosa o comprimento dos esôfagos médio foi de 14,61cm ($\pm 1,43$). Observou-se que 100% (9/9) das lesões foram verificadas na junção gastroesofágica (JGE), com 44,45% (4/9) do exsudato caseoso focal, 33,33% (3/9) multifocal a coalescente e 22,22% (2/9) multifocal. A intensidade foi discreta em 77,78% (7/9) e moderada em 22,22% (2/9). O tamanho do cáseo variou de 0,1 cm a 2,5 cm, com 88,89% (8/9) dos animais sem obstrução esofágica e 11,11% (1/7) com obstrução parcial do lúmen (Figura 3).

Figura 3. Fotomacrografia de esofagite caseosa em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) encontradas naturalmente mortas na costa brasileira entre janeiro e outubro de 2019 com evidenciação do cáseo (círculo pontilhado e setas). A) distribuição focal e intensidade discreta (círculo pontilhado). B) distribuição multifocal e intensidade discreta (setas). C) distribuição multifocal a coalescente e intensidade moderada (setas). D) distribuição multifocal a coalescente com obstrução parcial discreta do lúmen (setas).



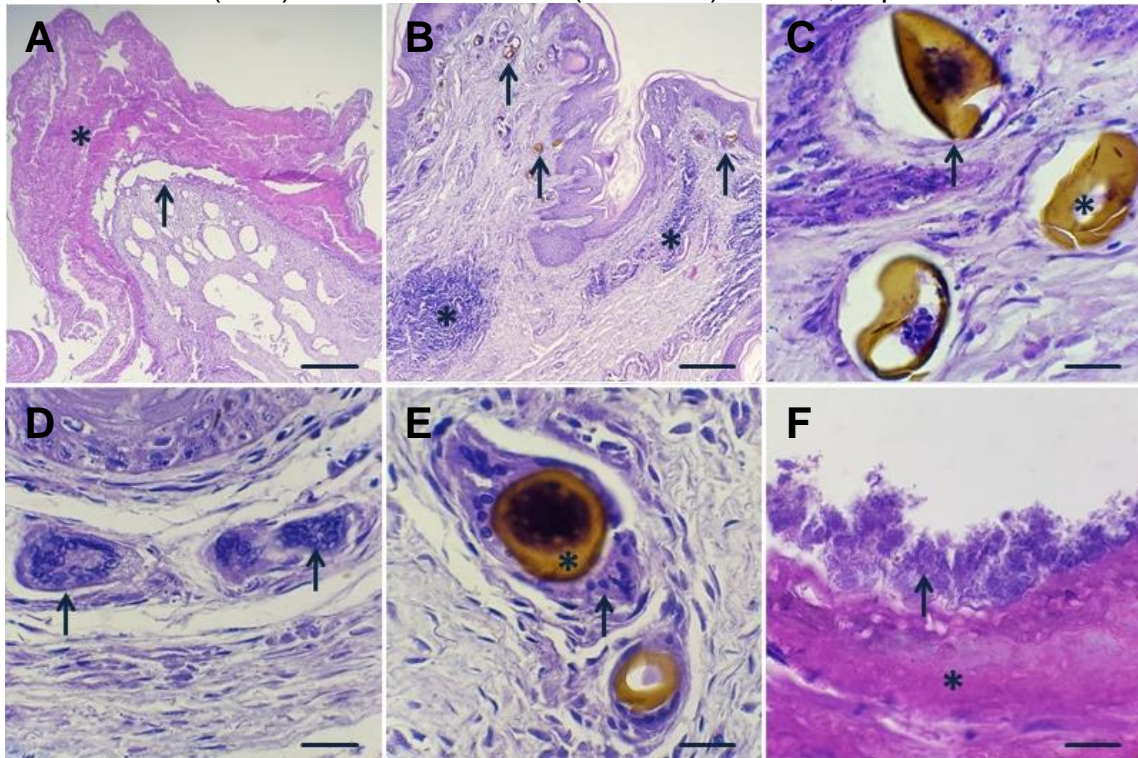
Fonte: o autor

Microscopicamente, na mucosa, observou-se ulceração focal em 44,45% (4/9) dos epitélios, focalmente extensa em 33,33% (3/9) e multifocal a coalescente em 22,22% (2/9). Observou-se ainda presença de cáseo discreto em 55,55% (5/9) e moderado em 44,45% (4/9) das áreas ulceradas. Na lâmina própria observou-se infiltrado inflamatório mononuclear com distribuição multifocal a coalescente em 44,45% (4/9) das amostras, multifocal em 33,33% (3/9) e focal em 22,22% (2/9). A intensidade do infiltrado inflamatório foi discreta em 55,55% (5/9) e moderada em 44,45% (4/9) (Figura 4).

Constatou-se a ocorrência de grumos bacterianos em 66,67% (6/9) das lesões, concomitante ao cáseo e/ou a ulceração. A distribuição foi multifocal em 50,00% (3/6) das amostras, multifocal a coalescente em 33,33% (2/6), e focal em 16,67% (1/6), com 66,67% (4/6) das colônias com intensidade discreta e 33,33% (2/6) moderada (Figura 4).

Em todas as amostras foram observados ovos de parasitos de coloração marrom a dourada (íntegros e degenerados) e/ou células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho em epitélio e/ou lâmina própria da mucosa. Houve predominância dessas estruturas na lâmina própria (Figura 4).

Figura 4. Fotomicrografia de esofagite ulcerativa caseosa em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) encontradas mortas naturalmente na costa brasileira entre janeiro e outubro de 2019. A) Cáseo (asterisco) aderido à mucosa ulcerada (seta) HE. Barra = 100,00 μm . B) Infiltrado inflamatório mononuclear (asterisco) e ovos de parasito (setas) em lâmina própria HE. Barra = 100,00 μm . C) Ovos de parasitos em epitélio (seta) e em lâmina própria (asterisco) HE. Barra = 50,00 μm . D) Células multinucleadas do tipo corpo estranho em lâmina própria (setas) HE. Barra = 50,00 μm . E) Ovo de parasito (asterisco) circundado por células multinucleadas do tipo corpo estranho em lâmina própria (seta) HE. Barra = 50,00 μm . F) Colônias bacterianas (seta) aderidas ao cáseo (asterisco) HE. 50,00 μm .

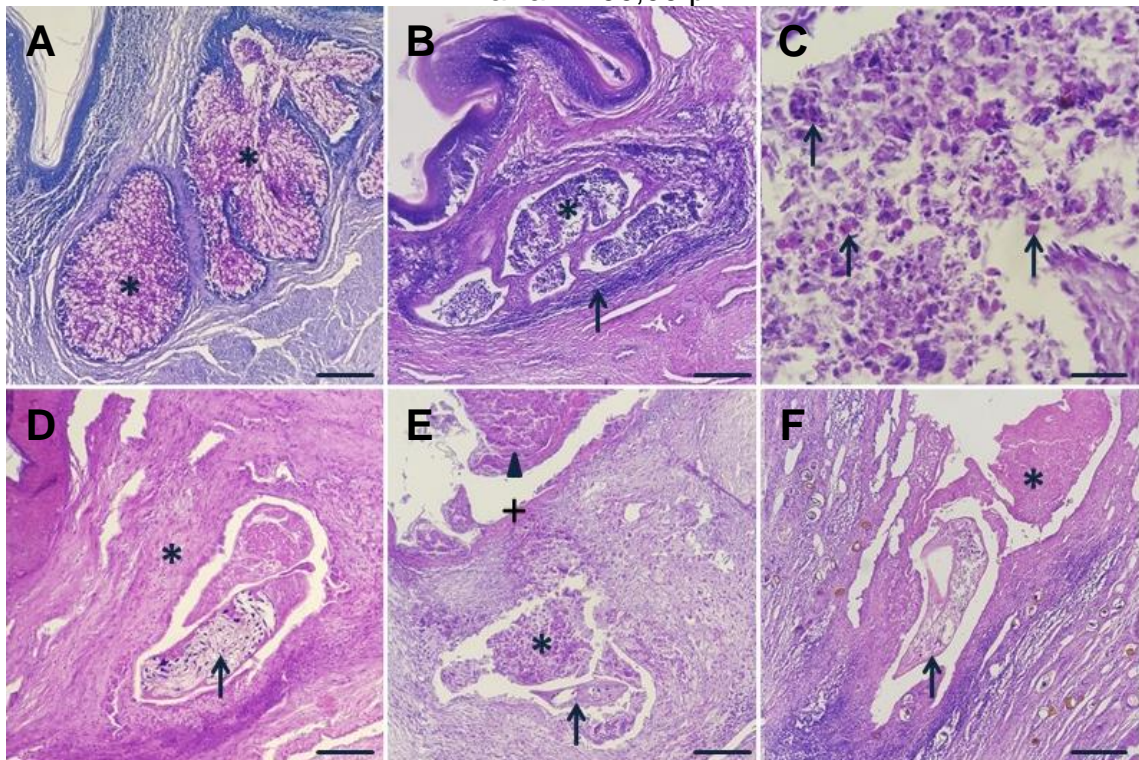


Fonte: o autor

A análise microscópica ainda revelou 77,78% (7/9) das glândulas esofágicas com inflamação mononuclear e necrose e em 57,14% (4/7) dos casos verificou-se também a presença de fragmentos de parasitos adultos. Em 22,22% (2/9) das glândulas não foram observadas alterações e, em apenas 14,28% (1/9) das amostras, foi observado fragmento de parasito adulto junto ao cáseo (Figura 5).

Sobre a ocorrência das alterações nas demais camadas do esôfago, constatou-se apenas a ocorrência de infiltrado inflamatório em 22,22% (2/9) na musculatura lisa, multifocal discreto em ambos os casos. Não foram observadas alterações na serosa.

Figura 5. Fotomicrografia de glândulas esofágicas tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) encontradas mortas naturalmente na costa brasileira entre janeiro e outubro de 2019. A) Glândula sem alterações com conteúdo mucoso evidenciado (asterisco) PAS. Barra = 100,00 μ m. B) Infiltrado inflamatório mononuclear periglandular (seta) e no lúmen glandular e necrose (asterisco) HE. Barra = 100,00 μ m. C) Conteúdo necrótico no lúmen glandular (setas) HE. Barra = 50,00 μ m. D) Fragmento de parasito adulto (seta) associado à necrose glandular (asterisco) HE. Barra = 100,00 μ m. E) Fragmento de parasito adulto (seta) associado à necrose glandular (asterisco), ulceração (cruz) e cáseo (triângulo) HE. Barra = 100,00 μ m. F) Presença de fragmento de parasito adulto em área de ulceração (seta) com cáseo (asterisco) HE. Barra = 100,00 μ m.



Fonte: o autor

A correlação de Spearman demonstrou que não houve correlação entre cáseo, grumos bacterianos, parasitos e cultivo microbiológico. No entanto, houve correlação positiva entre grumos bacterianos e cultivo microbiológico ($\rho=0,16$) e negativa entre grumos bacterianos e parasitos ($\rho=-0,16$) e entre parasitos com cultivo microbiológico ($\rho=-0,1$).

5. DISCUSSÃO

A biometria dos animais utilizados neste estudo assemelha-se com os de Forattini (2011) que avaliou 31 animais também na costa capixaba e verificaram massas corpóreas entre 2,6 e 20,2 kg ($6,8 \pm 2,9$ kg), valor de CCC de 27,6 a 53,4 cm ($38,4 \pm 5,09$ cm) e LCC entre 26,1 e 49,7 cm ($34,6 \pm 4,6$ cm). Isto evidencia a alta ocorrência de *Chelonia mydas* juvenis no litoral do Espírito Santo.

A predominância de indivíduos na fase juvenil também foi observada por Bezerra *et al.* (2012), pois é nessa fase que a tartaruga-verde adquire hábito alimentar herbívoro, e passa a habitar águas costeiras onde a vegetação marinha é abundante, assim, são comumente observados em regiões próximas a costa (BJORNDAL, 1985).

Os dados do presente estudo revelaram que a microbiota do esôfago de *C. mydas* é constituída por maior diversidade de bactérias Gram-negativas e, em menor proporção, Gram-positivas. As bactérias mais prevalentes nos esôfagos dos animais vivos foram *Pseudomonas aeruginosa*, seguido de *Staphylococcus aureus*, depois de *Aeromonas hydrophila* e *Vibrio alginolyticus*. De forma semelhante, Santoro *et al.* (2006) encontraram 21 espécies de agentes Gram-negativos e oito de Gram-positivos em regiões nasais e cloacais de tartarugas-verdes fêmeas em nidificação, com a identificação de *A. hydrophila*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, e *V. alginolyticus*, por exemplo. Por outro lado, estes mesmos micro-organismos foram isolados por Orós *et al.* (2005) em casos de esofagite ulcerativa e/ou fibrinosa em *C. mydas* e *Caretta caretta* de vida livre, verificando a infecção secundária dos agentes ao trauma por artefatos de pesca na mucosa esofágica.

Neste contexto, os exames microbiológicos das esofagites caseosas revelaram bactérias que também foram encontrados nos esôfagos de *C. mydas* híginas, com predomínio de *S. aureus*, *A. hydrophila* e *V. alginolyticus*. Com isso, observa-se que a tartaruga-verde, assim como todo réptil, exibe microbiota diversa, constituída por espécies bacterianas oportunistas e com potencial patogênico. E apesar de não ter sido encontrada nenhuma lesão traumática por anzol ou qualquer outro artefato de pesca neste estudo, acredita-se que as infecções bacterianas nas esofagites possam ser desencadeadas por diversos outros fatores como o comprometimento do sistema imune, por exemplo.

Vale ressaltar que *A. hydrophila*, *Staphylococcus* spp. e *V. alginolyticus* são patógenos oportunistas comumente isolados de lesões em diversos órgãos de *C. mydas* de vida livre e cativas. No cativeiro estes agentes estão comumente relacionados com o desenvolvimento de dermatite e estomatite ulcerativas, rinite obstrutiva e broncopneumonia, tendo o estresse e/ou trauma como fatores predisponentes para infecção (GAZEBROOK; CAMPBELL; THOMAS, 1993). No entanto, Óros *et al.* (2005) isolaram os mesmos agentes em tartarugas-verdes de vida livre acometidas por dermatite ulcerativa, pleurite e pneumonia granulomatosa, esplenite necrotizante, esofagite ulcerativa, hepatite granulomatosa/necrotizante e miosite. Além disso, Orós, Calabuig e Déniz (2004) detectaram o gênero *Staphylococcus* em 22,58% das doenças bacterianas em tartarugas marinhas de vida livre. Com isso, pode-se sugerir que as tartarugas-verdes de vida livre, assim como as cativas, estão sujeitas a fatores predisponentes para infecção da microbiota como, por exemplo, traumas (de origem antrópica), poluição, doenças virais e parasitismo.

A ocorrência de espécies de *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii* e *V. parahaemolyticus*) pode ser explicada pelo fato destes micro-organismos habitarem ambientes marinhos e estuários, que apresentam cloreto de sódio (NaCl), necessário para o seu crescimento (SILVEIRA *et al.*, 2016). Reis *et al.* (2010) detectaram 88,2% de resultados positivos para *Vibrio* em regiões oral, nasal, cloacal e de ferimentos de *C. mydas* juvenis de vida livre. Assim, acredita-se que devido ao esôfago estar em contato constante com a água salina, por meio da alimentação e expulsão do excesso d'água, possa ocorrer o favorecimento desses agentes na mucosa esofágica.

Aeromonas e *Pseudomonas* estão presentes na água doce e salgada (NARAYANAN, 2016) e sua presença no esôfago de *C. mydas* pode ser justificada pelos mesmos fatores da ocorrência de *Vibrio*. Reis *et al.* (2010) observaram 59,2% de *Aeromonas* spp. em regiões oral, nasal, cloacal e de ferimentos de tartarugas-verdes juvenis. No mesmo contexto, Santoro *et al.* (2006) constataram a ocorrência de 25,7% de *P. aeruginosa* e 22,8% de *A. hydrophila* em cavidade nasal e cloaca de fêmeas de *C. mydas* adultas.

No presente estudo *P. aeruginosa* foi o micro-organismo com maior frequência de isolamento nos esôfagos de *C. mydas* hípidas e a explicação para isto pode ser devido ao fato do agente ser um forte indicador de contaminação hídrica

(GUILHERME; SILVA; OTTO, 2000). A região costeira, onde os animais foram obtidos, sofre com a ocupação e pressão humana, o que torna o espaço sujeito a ação antrópica e introdução de fontes de poluição, como indústrias, agricultura e atividades domésticas, que fornecem produtos químicos e matéria orgânica aos mares. O esgoto, por exemplo, contém diversas impurezas, que podem transmitir doenças, causar intoxicação e até mesmo a morte da flora e fauna marinha (FERNANDES, 2016).

Foram verificadas quatro espécies de enterobactérias (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli* e *Proteus vulgaris*) no presente estudo. A família das Enterobacteriaceae inclui 46 gêneros e 293 espécies e constitui a maior e mais heterogênea família de bactérias Gram-negativas (MOXLEY, 2016), o que justifica a diversidade de agentes desta família observados no estudo. Santoro *et al.* (2006) constatou 53,1% de enterobactérias em regiões nasais e cloacais de tartarugas-verdes, com isolamento de *E. agglomerans*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* e *Serratia marcescens*.

Ribeiro *et al.* (2015) comprovaram a predominância desses micro-organismos na microbiota gastrointestinal de jabuti-piranga (*Chelonoidis carbonaria*), com a maior ocorrência de *Escherichia coli*, corroborando com os dados do presente estudo. As enterobactérias de modo geral, especialmente *E. coli*, são mais comumente encontradas no trato digestório devido às condições apropriadas para o seu crescimento como nutrientes e temperatura adequada (MOXLEY, 2016).

Espécies de *Staphylococcus* estão presentes na pele e nas superfícies epiteliais de todos os animais de sangue quente (SMELTZER; BEENKEN, 2016), com relatos em cloaca e cavidade nasal de tartarugas-verdes (SANTORO *et al.*, 2006) e cavidade oral de cágado-de-barbicha (*Phrynops geoffroanus*) (FERRONATO *et al.* 2009). No entanto, até o presente momento, este agente ainda não havia sido relatado em esôfago hígido de *C. mydas*. O gênero está comumente envolvido com o desenvolvimento de doenças bacterianas em tartarugas marinhas, com desenvolvimento de lesões em diversos tecidos e órgãos de caráter secundário e oportunista. Orós, Calabuig e Déniz (2004) detectaram o gênero em 22,58% das doenças em tartarugas marinhas, entre elas casos de esofagite ulcerativa, esplenite granulomatosa, estomatite ulcerativa, pneumonia granulomatosa e pericardite.

Considerados agentes onipresentes na natureza, *Bacillus* spp. habita solo, água, ocorrendo em diversas superfícies (STEWART; THOMPSON, 2016). E, assim

como todos os micro-organismos previamente citados, fazem parte da microbiota de *C. mydas*, sendo isolado em proporção semelhante ao presente estudo, por Santoro *et al.* (2006) em cavidade nasal e cloaca de tartarugas-verdes.

Em relação às alterações morfológicas da esofagite caseosa, notou-se que todas as lesões eram localizadas na junção gastresofágicas, assemelhando-se aos achados de Calais Júnior (2015). O fato de a JGE apresentar glândulas produtoras de muco (CALAIS JÚNIOR, DAVID, NUNES, 2015), que podem albergar parasitos trematodas (CALAIS JÚNIOR, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2017; SANTORO *et al.*, 2007) pode justificar a alta prevalência de lesão nessa porção. Parasitos, como *Rameshwarotrema uterocrescens* são responsáveis por inflamação e necrose glandular no esôfago de *C. mydas* (JERDY *et al.* 2019; SANTORO *et al.*, 2007).

O presente estudo verificou a predominância de lesões caseosas macroscópicas multifocais a coalescentes, divergindo de Calais Júnior (2015) que observou a prevalência da distribuição multifocal. Tendo em vista que cáseo se desenvolve até obstruir por completo o lúmen esofágico, é possível que a lesão se inicie em vários focos que se unem até formar massa caseosa maior.

Histologicamente, observou-se cáseo e ulceração em todas as amostras avaliadas, além de infiltrado inflamatório mononuclear. A inflamação caseosa é comumente observado em répteis, e é caracterizada pelo exsudação de heterófilos (degranulados e/ou degenerados) que se acumulam e formam, macroscopicamente, massa branco-amarelada de consistência friável. O heterófilo dos répteis corresponde ao neutrófilo de mamíferos e tem papel importante no combate a invasão de micro-organismos como bactérias, fungos, vírus e protozoários (MONTALI, 1988). A ulceração da mucosa também foi observada por Calais Júnior (2015), Jerdy *et al.* 2019; Ribeiro *et al.* (2017) e Santoro *et al.* (2007), e pode estar relacionada ao parasito, quando situado em lâmina própria, ou até mesmo às enzimas lesivas liberadas durante o processo inflamatório (MONTALI, 1988).

O infiltrado inflamatório mononuclear em lâmina própria também foi observado por Calais Júnior (2015). Com isso pode inferir que as áreas de inflamação indicam um processo crônico na mucosa esofágica, uma vez que de acordo com Pereira (2011) inflamações crônicas são caracterizadas por exsudação de células mononucleares (como macrófagos e linfócitos), necrose e/ou degeneração e regeneração e/ou reparação, alterações encontradas nos tecidos esofágicos avaliados.

O estudo em questão constatou colônias bacterianas nas esofagites caseosas, fato comprovado também por outros autores (CALAIS JÚNIOR, 2015; JERDY *et al.* 2019; OCHOA, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2017; SANTORO *et al.*, 2007). A relevante associação bacteriana pode ser explicada pelo fato do heterófilo ter um papel importante no combate à invasão bacteriana (MONTALI, 1988). Calais Júnior (2015) observou cocos Gram-positivos em 56,75% das lesões caseosas e concluiu que as bactérias são importantes para formação do cáseo e obstrução do esôfago.

Além disso, a ocorrência bacteriana foi concomitante a presença de ovos trematodas em mucosa e/ou fragmentos de parasitos adultos associados à necrose e adenite. Parasitos adultos estão relacionados com processos inflamatórios agudos e crônicos em diversos tecidos e órgãos de tartarugas-verdes (STACY *et al.*, 2010). Santoro *et al.* (2007) identificaram parasitos da família Spirorchidae associados a inflamações crônicas em tecidos cardiovascular, gastrointestinal e pulmonar, além de relatar casos de infecção bacteriana secundárias associadas as lesões parasitárias. Jerdy *et al.* (2019), Ribeiro *et al.* (2017) e Santoro *et al.* (2007) descreveram que os quadros de esofagite em tartarugas-verdes são decorrentes do parasitismo em glândulas esofágicas por *Rameshwarotrema uterocrescens* com infecção bacteriana secundária por agentes Gram-positivos. Entretanto, Calais Júnior (2015), em um estudo realizado também na costa capixaba, observou a ocorrência de quatro famílias diferentes de trematodas (Pronocephalidae, Microscaphidae, Cladorchiidae e Rhytidodidae) nos esôfagos com lesão, sendo a família do *R. uterocrescens*, uma dentre as descritas, além de bactérias Gram-positivas. Estes dados indicam que muitos outros parasitos, além do gênero *Rameshwarotrema* podem estar envolvidos na etiologia das lesões esofágicas obstrutivas em *C. mydas*.

Com isso, acredita-se que esses parasitos atuam como agentes lesivos primários nas inflamações de esôfago, gerando porta de entrada para infecção por bactérias oportunistas e patogênicas, da própria microbiota, ou mesmo, que a lesão seja de origem multifatorial, em que os parasitos e as bactérias agem como cofatores, ou seja, associados.

Os parasitos, principalmente, trematodas são de ocorrência comum em *C. mydas* e depositam seus ovos em diversos órgãos, que não levam a morte da tartaruga-verde, no entanto, podem contribuir para o encalhe e morte de animais

juvenis (devido à imunidade não desenvolvida), ou predispor a doenças secundárias (SANTORO; MORALES; RODRÍGUES-ORTIZ, 2007).

Em sua pesquisa Binotti *et al.* (2016) encontrou ovos de parasitos intactos ou degenerados, com ou sem células gigantes, em baço, pulmão, músculos estriados esqueléticos, intestino delgado e grosso, rim, glândulas salgadas, fígado, estômago, músculo cardíaco, pâncreas, pele, esôfago, glândulas supra-renais sem lesões macroscópicas. A presença do ovo leva ao desenvolvimento das células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho, que são formadas pela fusão de macrófagos e se formam ao redor de estruturas não imunogênicas como fios de suturas e ovos de parasito (PEREIRA, 2011). Com isso pode-se sugerir que a observação somente das células gigantes multinucleadas indica que o ovo foi fagocitado e eliminado do tecido. Além disso, acredita-se que a presença do ovo no tecido não, necessariamente, causa lesão.

Neste estudo também se observaram adenite e necrose glandular na mucosa esofágica que Jerdy *et al.* (2019), Ribeiro *et al.* (2017) e Santoro *et al.* (2007) associaram ao agente *R. uterocrescens*, no entanto, não foi possível identificar a espécie dos parasitos, limitando-se a classificar os agentes como trematodas.

Desta forma, a localização dos trematodas intraglandulares pode justificar a presença dos ovos em lâmina própria. No entanto, não existem dados na literatura sobre o ciclo biológico dos parasitos encontrados nos esôfagos de *C. mydas*, não sabendo exatamente o percurso realizado pelo agente parasitário para se alojar na glândula, bem como, a maneira com que os mesmos depositam seus ovos.

Por outro lado, os dados obtidos neste estudo, pelos testes estatísticos, também mostraram que quando há aumento de bactérias, seja pela observação dos grumos à microscopia ou pelos agentes microbianos isolados, há diminuição da carga parasitária. No entanto, a correlação negativa observada foi muito fraca e, pode estar relacionada à cronicidade da lesão e ao fato do parasito não mais ser observado.

6. CONCLUSÃO

A microbiota esofágica de *Chelonia mydas* é constituída por predomínio de bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* e *Vibrio alginolyticus*, além de diversas enterobactérias e por agentes Gram-positivos, com maior prevalência de *Staphylococcus aureus* e esses agentes estão envolvidos na etiologia da esofagite caseosa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, M.R. Inflamação e cicatrização In: ZACHARY, J.F.; MCGAVIN, M.D. **Bases da Patologia Veterinária**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013, p. 309-310.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA A SANITÁRIA (Anvisa). 2004. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf>. Acesso em 20 de dezembro de 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA A SANITÁRIA (Anvisa). 2008. Módulo 4: Gram-positivos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/intr_sta.htm>. Acesso em 20 de dezembro de 2019.

AWABDI, D.; RODRIGUES, S.; BENEDITTO, A. P. M. D. Ingestão de resíduos sólidos por tartarugas-verdes juvenis, *Chelonia mydas* (L. 1758), na costa leste do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Biotemas**, v. 26, n. 1, p. 197-200, 2013. DOI:10.5007/2175-7925.2013v26n1p197.

BAPTISTOTTE, C. Testudines marinhos (tartarugas marinhas). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 259-270.

BEZERRA *et al.* Mercury in these a turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) from Ceará coast, NE Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.84, n.1, p.123-128, 2012. DOI: 10.1590/S0001-37652012005000002.

BINOTI, E. et al. Helminthfauna of *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) in the south of Espírito Santo State in Brazil. **Helminthologia**, v.53, n.2, p.195-199, 2016. DOI: 10.1515/helmin-2016-0012.

BJORNDAL, K. A. Nutritional ecology of sea turtles. **Copeia**, v. 1985, n. 3, p. 736-751. 1985.

BURKE, J.B; RODGERS, L.J. Gastric ulceration associated with larval nematodes (*Anisakis* sp. type I) in pen reared green turtles (*Chelonia mydas*) from Torres Strait. **Journal of Wildlife Diseases**, v.18, n.1, p.41-46, 1982. DOI: 10.7589/0090-3558-18.1.41.

CALAIS JÚNIOR, A. Caracterização histomorfológica e histoquímica de esôfagos de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) com e sem alterações no litoral do Espírito Santo. Orientador: Louisiane de Carvalho Nunes. 2015. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2015.

CALAIS JÚNIOR, A.; DAVID, J.A.O.; NUNES, L.C. Caracterização morfológica do esôfago de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.1, p.127-135, 2016. DOI: 10.1590/1678-4162-8548.

DOMINICANO, I.G. *et al.* The green turtle *Chelonia mydas* as a marine and coastal environmental sentinels: anthropogenic activities and diseases. **Semina: Ciências Agrárias**, v.38, n.5, p.3417-3434, 2017. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n5p3417.

DONNELLY, K. *et al.* Phaeohyphomycosis resulting in an obstructive tracheitis in three green sea turtles *Chelonia mydas* stranded along the Florida coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 113, n. 3, p. 257-262, 2015. DOI: 10.3354/dao02843.

FERNANDES, L. Ocupação da zona costeira. In: GERLING, C. *et al.* **Manual de ecossistemas marinhos e costeiros para educadores**. São Paulo: Editora Comunicar, 2016, p. 43.

FERRONATO B.O. *et al.* Oral bacterial microbiota and traumatic injuries of freeranging *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) in south eastern Brazil. **Phyllomedusa**, v.8, n.1. p.19–25, 2009. DOI: 0.11606/issn.2316-9079.v8i1p19-25.

FORATTINI, J.G. Concentrações de testosterona plasmática em uma população juvenil de *Chelonia mydas* no efluente industrial de uma companhia siderúrgica, Vitória, Espírito Santo. Orientador: Flaviana Lima Guião Leite. 2011. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Mestrado em Ciência Animal, Centro Universitário Vila Velha, Vila Velha, 2011.

GAGLIARDI T.R.; LOPES, T.C; SERAFIM, T.Z. Interação de tartarugas marinhas e a pesca no Brasil: uma revisão da literatura. **Arquivos da Ciências do Mar**, v.51, n.1, p.101-124, 2018. DOI: 10.32360/acmar.v51i1.20354.

GLAZEBROOK, J. S.; CAMPBELL, R. S. F. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. I. Farmed turtles. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.9, n.1, p.83-95, 1990. DOI: DOI:10.3354/dao009083.

GLAZEBROOK J.S.; CAMPBELL R.S.F.; THOMAS A.T. Studies on an ulcerative stomatitis-obstructive rhinitis-pneumonia disease complex in hatchling and juvenile sea turtles *Chelonia mydas* and *Caretta caretta*. **Disease of Aquatic Organisms**, v.16, n.1, p.133-147, 1993. DOI: DOI:10.3354/dao016133.

GOMES, M. C. *et al.* Ecologia da comunidade de helmintos gastrointestinais de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) recolhidas no litoral do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.3, p. 644-650, 2017. DOI: 10.1590/1678-4162-9039.

GUILHERME, E.F.M.; SILVA, J.A.M.; OTTO, S.S. *Pseudomonas aeruginosa*, como indicador de contaminação hídrica/*Pseudomonas aeruginosa* as na indicator of water contamination. **Revista HigieneAlimentar**, v.14, n.76, p.43-47, 2000.

HERBST, L.H. Fibropapillomatosis in marine turtles. **Annual Review of Fish Diseases**, v.4, p.391-398, 1994.

HIRTH, H.F. **Synopsis of the Biological Data on the Green Turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758)**. Washington, D.C.: Fish and Wildlife Service U. S. Department of the Interior, 1997.

JERDY, H. *et al.* Fatal *Rameshwartrema uterocrescens* infection with ulcerative esophagitis and intravascular dissemination in green turtles. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.9, p.281-284, 2019.

KLINGENBERG, R. J. **Understanding reptile parasites**. 2.ed. Lakeside city: Advanced Vivarium Systems, 2007. 85p.

MAGALHÃES, M.S. *et al.* Morfologia do tubo digestório da tartaruga verde (*Chelonia mydas*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.8, p.676-684, 2010. DOI:10.1590/S0100-736X2010000800012.

MATUSHIMA, E. R. *et al.* Cutaneous papillomas of green turtles: a morphological, ultra-structural and immunohistochemical study in Brazilian specimens. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.2, p. 51-54, 2001. DOI: 10.1590/S1413-95962001000200001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2010. Manual integrado de vigilância epidemiológica da cólera. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_colera2ed.pdf>. Acesso em 20 de dezembro de 2019.

MONEZI, T. A. *et al.* Chelonid herpesvirus 5 in secretions and tumor tissues from green turtles (*Chelonia mydas*) from southeastern Brazil: a ten-year study. **Veterinary Microbiology**, v.186, n.1, p.150-156, 2016. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.02.020.

MONTALI, R.J. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). **Journal of Comparative Pathology**, v.99, p.1-26, 1988. DOI:10.1016/0021-9975(88)90101-6.

MOXLEY, R. Família Enterobacteriaceae. In: MCVEY, D. S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016, p.55-57.

NARAYANAN, S. Pseudomonas. In: MCVEY, D. S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016, p.153-155.

OCHOA, P.F.C Achados anatomo e histopatológicos de tartarugas verdes juvenis (*Chelonia mydas*) provenientes do litoral sudeste brasileiro. Orientador: Eliana Reiko Matushima. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada, Universidade São Paulo, São Paulo, 2017.

ORÓS, J.; CALABUIG, P.; DÉNIZ, S.; Digestive pathology of sea turtles stranded in the Canary Islands between 1993 and 2001. **The Veterinary Record**, v.155, n.6, p.169-74, 2004. DOI: 10.1136/vr.155.6.169.

ORÓS, J. *et al.* Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.63, p.13-24, 2005. DOI: 10.3354/dao063013.

PEIXOTO, L.J.S. *et al.* *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.3, p.453-461, 2012. DOI: 10.1590/S1808-16572012000300020.

PEREIRA, F.E.L. Inflamações. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Patologia Bogliolo**. 8ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2011, p.195-213.

PRITCHARD, P. C. H.; MORTIMER, J. A. Taxonomy, external morphology, and species identification. In: ECKERT, K. L.; BJORN DAL, K. A.; ABREU-GROBOIS, F. *et al.* **Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles**, Washington DC: Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4, 1999. p.1-18.

PROJETO TAMAR. Tartarugas marinhas. Disponível em <<http://www.tamar.org.br/tartaruga.php?cod=20>>. Acesso em 16 de fevereiro de 2020, 13:30.

REIS, E.C. *et al.* Condição de saúde das tartarugas marinhas do litoral centro norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil: avaliação sobre a presença de agentes bacterianos, fibropapilomatose e interação com resíduos antropogênicos. **Oecologia Australis**, v.14, n.3, p.756-765, 2010. DOI: 10.4257/oeco.2010.1403.11.

RIBEIRO, M.M. *et al.* Análise da microbiota gastrointestinal de *Chelonoidis* provenientes de cativeiro da região noroeste de São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22, n.2, p.295-301, 2015. DOI: vti-699423.

RIBEIRO, R.B. *et al.* Parasitic ulcerous caseous gastroesophagitis associated with *Rameshwarotrema uterocrescens* Rao, 1975 (Digenea: Pronocephalidae) in a Juvenile Green Turtle [*Chelonia mydas*, Linnaeus 1758 (Testudines: Cheloniidae)]: A case report. **Journal of Parasitology**, v.103, n.3, p.292-294, 2017. DOI: 10.1645/16-106.

RODRIGUES, S. M. A. *et al.* Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa-MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.5, p. 407-411, 2001.

ROMANINI, E. Ecologia alimentar de tartarugas-verdes, *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758), em Ilhabela e Ubatuba – litoral norte de São Paulo, Brasil. Orientador: Ana Cristina Vigliar Bondioli. 2014. Ribeirão Preto. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2014.

SANTORO M. *et al.* Aerobic bacterial flora of nesting green turtles (*Chelonia mydas*) from Tortuguero National Park, Costa Rica. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.37, n.4, p.549–552, 2006. DOI: 10.1638/05-118.1.

SANTORO, M.; MORALES, J.A. RODRÍGUES-ORTIZ, B. Spirorchiidiosis (Digenea: Spirorchiiidae) and lesions associated with parasites in Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*). **Veterinary Record**, v. 161, n. 1, p.482-486, 2007. DOI: 10.1136/vr. 161.14.482

SANTORO, M. *et al.* *Rameshwarotrema uterocrescens* trematode parasitism of the oesophageal glands in green sea turtles (*Chelonia mydas*). **The Veterinary Record**, v.160, n.2, p.59-60, 2007. DOI: 10.1136/vr.160.2.59.

SANTOS, A. S. *et al.* Plano de ação nacional para a conservação das Tartarugas Marinhas. In: MARCOVALDI, M. A. A. G. D.; SANTOS, A. S. SALES, G. **Série Espécies Ameaçadas no 25**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMbio), 2011. p.21-57.

SILVEIRA, D. R. *et al.* Fatores de patogenicidade de *Vibrio* spp. de importância em doenças transmitidas por alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 83, p. 1-7, 2016. DOI: 10.1590/1808-1657001252013.

SMELTZER M.S; BEENKEN, K.E. *Staphylococcus*. **Microbiologia Veterinária**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016, p.?

STEWART G.G.; THOMPSON, B.M. *Bacillus*. **Microbiologia Veterinária**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016, p.211-216

UNIÃO INTERNACIONAL PARA CONSERVAÇÃO DA NATUREZA (IUCN). Red list of threatened species. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em 15 de fevereiro de 2020, 13:00.

VEGA-MANRIQUEZ, D.X. *et al.* Identification of bacteria present in ulcerative stomatitis lesions of captive sea turtles *Chelonia mydas*. **Veterinary Research Communications**, v.42, n. 3, p. 251-254, 2018. DOI: 10.1007/s11259-018-9728-y.

WERNECK, M.R., *et al.* *Learedius learedi* Price 1934 (Digenea, Spirorchiiidae) in *Chelonia mydas* Linnaeus 1758 (Testudines, Chelonidae) in Brazil: case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 550-555, 2006. DOI:10.1590/S0102-09352006000400016.

WERNECK, M. R. Estudo da Helmintofauna de Tartarugas Marinhas Procedentes da Costa brasileira. Botucatu-SP. Orientador: Reinaldo José da Silva. 2011. 147f. Tese (Doutorado em Biologia de parasitas e microorganismos), Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

WOLKE R.E, GEORGE A. **Sea Turtle Necropsy Manual**. NOAA Technical Memorandum NMFS SEFC-24, U.S. Department of Commerce, Panama City, Fl, 1981.