

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Biomarcadores de estresse e carcinogênese: um estudo em
*Chelonia mydas***

Leandro Abreu da Fonseca

**Vitória, ES
Fevereiro, 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Biomarcadores de estresse e carcinogênese: um estudo em
*Chelonia mydas***

Leandro Abreu da Fonseca

Orientador(a): Valéria Fagundes

**Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade
Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Biologia Animal**

**Vitória, ES
Fevereiro, 2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

F676b Fonseca, Leandro Abreu da, 1980-
Biomarcadores de estresse e carcinogênese : um estudo em
Chelonia mydas / Leandro Abreu da Fonseca. – 2014.
92 f. : il.

Orientador: Valéria Fagundes.
Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.

1. Marcadores biológicos. 2. Stress (Fisiologia). 3.
Bioquímica clínica. 4. Biologia molecular. 5. Tartaruga marinha.
6. *Chelonya mydas*. I. Fagundes, Valéria. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e
Naturais. III. Título.

CDU: 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO E DOUTORADO EM BIOLOGIA ANIMAL

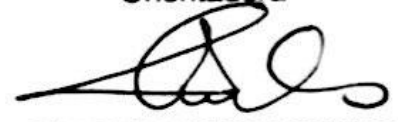
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

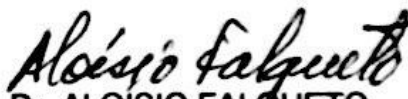
TÍTULO: "Biomarcadores de estresse e carcinogênese: um estudo em *Chelonia mydas*"

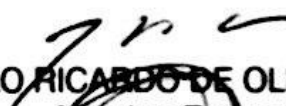
AUTOR: LEANDRO ABREU DA FONSECA
ORIENTADORA: Profa. Dra. VALÉRIA FAGUNDES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM BIOLOGIA ANIMAL, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL, pela comissão examinadora:


Dra. VALÉRIA FAGUNDES
Orientadora


Dr. SÉRGIO LUCENA MENDES
Membro Interno


Dr. ALOÍSIO FALQUETO
Membro Interno


Dr. PAULO RICARDO DE OLIVEIRA PAES
Membro Externo


Dr. RENATO RODRIGUES NETO
Membro Externo

DATA DA REALIZAÇÃO: Vitória, 24 de fevereiro de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por me fazer compreender que o único limite que existe é aquele que cada um de nós impõe.

A minha esposa Fabrícia Modolo Girardi, pelo amor, pelo companheirismo, pelo carinho, pelo respeito, pela ajuda, pela compreensão e pela paciência em todos os momentos difíceis que esteve ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Valéria Fagundes por ter confiado e me dado a oportunidade de concluir mais uma etapa na minha vida profissional.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Aos professores do PPGBAN por todas as orientações dadas, me proporcionando maior amadurecimento profissional.

À toda equipe do Laboratório de Genética Animal (LGA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em especial ao Arturo B. Martineli, Sílvia Ramira Lopes Pinto, Rosana Abrante Nunes, Marcela Paes, Marina Monjardim e Eduardo Loyola Muhl, pelo apoio durante as horas de dificuldades e na análise dos dados.

À Universidade Vila Velha (UVV) pelo apoio institucional e por ter concedido toda a estrutura para que desenvolvêssemos as análises hematológicas, bioquímicas e hormonais, em especial ao Professor Levy de Carvalho Gomes pela ajuda com as dosagens hormonais e ao Professor Edney Leandro da Vitória pela ajuda nas análises estatísticas.

À equipe do Laboratório Clínico Veterinário do HV “Prof. Ricardo Alexandre Hippler” da UVV, em especial ao técnico Fábio Porto Sena pelo auxílio nas análises bioquímicas e todos os residentes e estagiários que por lá passaram nos últimos 4 anos, que de alguma forma contribuíram para que tudo ocorresse da melhor forma possível.

À toda equipe do TAMAR, em especial a Cecília Baptistotte e Armando Santos e toda a equipe da coleta de Fernando de Noronha, pelo que apoio logístico e operacional tanto nas coletas em Vitória/ES quanto em Fernando de Noronha/PE.

Ao Professor Marcelo Renan de Deus Santos, por ter me dado a oportunidade de conhecer e trabalhar com as tartarugas marinhas e Marcilo Altoé e Marlon Lauro pela ajuda no desenvolvimento do trabalho de campo em Vitória/ES.

Ao Professor Paulo Ricardo de Oliveira Paes, mentor e amigo, a pessoa que foi responsável por me fazer seguir o caminho acadêmico.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	01
LISTA DE FIGURAS.....	02
RESUMO.....	04
ABSTRACT.....	05
1. INTRODUÇÃO.....	06
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	07
2.1. <i>Importância do uso de biomarcadores.....</i>	<i>07</i>
2.2. <i>O estresse e suas variações.....</i>	<i>07</i>
2.3. <i>Tartarugas marinha e os estudos sobre estresse.....</i>	<i>09</i>
2.4. <i>A fibropapilomatose como desencadeadora do estresse.....</i>	<i>11</i>
2.5. <i>Respostas bioquímicas em função do estresse.....</i>	<i>13</i>
2.6. <i>Respostas hematimétricas em função do estresse.....</i>	<i>15</i>
2.7. <i>Teste do micronúcleo eritrocitário e carcinogênese.....</i>	<i>17</i>
2.8. <i>A fibropapilomatose e o herpesvírus.....</i>	<i>19</i>
3. OBJETIVOS E METAS.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. <i>Áreas de estudo.....</i>	<i>21</i>
4.2. <i>Métodos de captura.....</i>	<i>22</i>
4.3. <i>Amostra.....</i>	<i>23</i>
4.4. <i>Coleta de sangue e tecidos.....</i>	<i>25</i>
4.5. <i>Análises bioquímicas e hormonais.....</i>	<i>25</i>
4.6. <i>Análises hematológicas e teste de micronúcleo.....</i>	<i>27</i>
4.7. <i>Análises moleculares.....</i>	<i>28</i>
4.8. <i>Análise estatística.....</i>	<i>29</i>
5. RESULTADOS.....	31
5.1. <i>Resposta ao estresse de captura e presença de fibropapilomas.....</i>	<i>32</i>
5.2. <i>Teste de micronúcleo e hemograma de acordo com a característica do ambiente.....</i>	<i>35</i>

5.3. <i>Teste de micronúcleo e hemograma de acordo com a presença de fibropapilomas.....</i>	38
5.4. <i>Teste da presença do DNA viral.....</i>	41
6. DISCUSSÃO.....	43
6.1. <i>Resposta ao estresse de captura.....</i>	43
6.2. <i>Resposta ao estresse na presença da fibropapilomatose.....</i>	46
6.3. <i>Resposta ao estresse em diferentes condições ambientais.....</i>	48
6.4. <i>Teste de micronúcleo e hemograma de acordo com a característica do ambiente.....</i>	50
6.5. <i>Teste de micronúcleo e hemograma de acordo com a presença de fibropapilomas.....</i>	52
6.6. <i>PCR das amostras de sangue e tecido tumoral.....</i>	57
7. CONCLUSÃO.....	59
8. REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO I.....	75
ANEXO II.....	81
ANEXO III.....	90
ANEXO IV.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Característica dos grupos de estudo (G1, G2, G3, G4 e G5) do presente estudo.....	24
Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos parâmetros bioquímicos e hormonais dos indivíduos de <i>Chelonia mydas</i> , de acordo com os grupos de estudo.....	32
Tabela 3. Resultados da presença de micronúcleo (média por grupo $\pm$ desvio padrão) em <i>C. mydas</i> de acordo com os grupos de estudo. Todos os valores diferiram significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Expressão do micronúcleo na hemácia em divisão, demonstrando a origem a partir do revestimento de cromossomos inteiros e de fragmentos de cromossomos acêntricos em uma célula em anáfase. Fonte: Modificado de Fenech <i>et al.</i> (2005).....	18
Figura 2. A. Diluição do plasma heparinizado para realização da dosagem de cortisol; B. Procedimento de lavagem em placa como procedimento prévio para o exame laboratorial; C. Leitora de ELISA para determinação das absorbâncias bioquímicas; D. Analisador semiautomático para determinação colorimétrica de glicose e lactato plasmáticos.....	26
Figura 3. Captura dos indivíduos e coleta de dados do grupo G1, na Baía do Sueste, Fernando de Noronha; A. Base do Projeto Tamar utilizada para montagem do laboratório de campo; B. Materiais de mergulho e de coleta utilizados; C e D., local de captura das tartarugas na área 1; E-H. Captura por perseguição contínua das tartarugas; I. Identificação e anilhamento do animal capturado na praia; J. Biometria e coleta de dados do animal capturado; L. Coleta de sangue em seio venoso cervical; M. Soltura dos animais após o procedimento de coleta e obtenção dos dados.....	30
Figura 4. A-C. Local de captura do grupo G1 no Efluente final da Siderúrgica ArcelorMittal Tubarão, Vitória, ES; D. Estação de monitoramento ambiental da Siderúrgica ArcelorMittal Tubarão, Vitória, ES, onde foram manipulados os animais capturados; E-F. Captura por meio de tarrafa; G. Parte interna da Estação de monitoramento ambiental, destacando o material utilizado para biometria e coleta de material dos animais; H. Biometria do animal capturado; I. Identificação e anilhamento do animal capturado; J. Coleta de sangue em seio venoso cervical; L-M. Animais capturados com presença de fibropapilomatose (setas).....	31
Figura 5. Gráfico da análise de regressão logística, codificando os grupos de acordo com: $Y=1$ com presença de fibropapiloma, e $Y=0$ com ausência de fibropapiloma.....	33
Figura 6. Gráfico da análise de regressão logística, codificando os grupos de acordo com: $Y=1$ se o nível de estresse foi elevado, e $Y=0$ se o nível de estresse foi baixo.....	34
Figura 7. A. Demonstração da técnica de confecção do esfregaço sanguíneo; B. Eritrócitos micronucleados (setas) evidenciando micronúcleo em eritrócitos de tartarugas verdes.....	35

Figura 8. Gráfico da análise de regressão logística da quantidade de micronúcleo, codificando os grupos de acordo com: $Y=1$ ambiente com dejetos industriais, e $Y=0$ boa qualidade do ambiente sem dejetos industriais.....	36
Figura 9. Demonstração do número de leucócitos totais, heterófilos e linfócitos, em função da característica do ambiente e linha de tendência.....	36
Figura 10. Gráfico da análise de regressão logística da quantidade de micronúcleo, codificando os grupos de acordo com: $Y=1$ presença de fibropapiloma, e $Y=0$ ausência de fibropapiloma.....	39
Figura 11. Demonstração do número de leucócitos totais, heterófilos e linfócitos, em função do estado de saúde e linha de tendência.....	39
Figura 12. Corte histológico do tecido tumoral evidenciando as alterações descritas acima e que caracterizaram o fibropapiloma.....	41
Figura 13. Gel de agarose 3% demonstrando as reações de PCR para o <i>Chelonid Herpesvirus 5</i> nas massas tumorais (acima) e no sangue (abaixo) de tartarugas verdes com fibropapilomatose.....	42
Figura 14. Gel de agarose 3% demonstrando as reações de PCR negativas para o <i>Chelonid Herpesvirus 5</i> no sangue de tartarugas verdes sem fibropapilomatose.....	42

RESUMO

O uso de biomarcadores tem sido proposto como uma ferramenta sensível para alertar sobre os efeitos biológicos devido ao estresse e poluentes químicos, tendo como principal característica, o fato de que sua avaliação e quantificação podem ser utilizadas de maneira preditiva a mudanças futuras, podendo refletir nos altos níveis de organização biológica, isto é, população, comunidade ou ecossistema. O objetivo desse trabalho foi identificar possíveis biomarcadores relacionados ao estresse e ao desenvolvimento de fibropapilomas em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*). Para isso, avaliamos as respostas provocadas pelo estresse nos níveis plasmáticos de glicose, lactato e cortisol, em tartarugas submetidas a dois processos distintos de captura e contenção, e também em duas condições distintas de saúde, com e sem fibropapilomatose. Ainda, testamos se defeitos cromossômiais, visualizados por meio do teste do micronúcleo em eritrócitos, tinham relação com localidades de diferentes ações antropogênicas e em grupos de indivíduos afetados ou não pela fibropapilomatose. Por fim, testamos se a presença do Chelonid herpesvirus 5 em amostras de sangue ocorre com a mesma frequência que nos tecidos tumorais, representando assim, um biomarcador importante e menos invasivo no diagnóstico da fibropapilomatose. Nossa amostra foi composta por 5 grupos experimentais (G1, G2, G3, G4 e G5), totalizando 180 animais. O G1 foi composto de 34 animais sem qualquer sinal de fibropapiloma e capturados em uma área de conservação federal em Fernando de Noronha-PE. Os grupos G2, G3, G4 e G5 foram formados por animais capturados em um efluente de Companhia Siderúrgica em Vitória-ES, sendo que G2 foi composto por 66 animais sem sinais de fibropapilomas, G3 foi composto por 40 animais com fibropapilomas. O grupo G4 é formado por 20 animais com fibropapilomas e o grupo G5 por 20 sem fibropapilomatose, sendo que ambos os grupos foram exclusivos para as análises moleculares. Todos os animais capturados eram juvenis conforme critérios propostos por HIRTH (1997). Dos 180 exemplares da nossa amostra, somente as tartarugas do grupo G3 (n=40) e G4 (n=20) coletadas em Vitória/ES, ou seja, 33,33% da amostra total apresentaram fibropapilomas, em diferentes graus. Verificamos que os valores dos níveis plasmáticos de cortisol e do lactato apresentaram-se mais elevados no grupo G1 quando comparados com o grupo G2. Em contrapartida, os níveis plasmáticos de glicose foram significativamente menores no grupo G1 em relação ao grupo G2. Nossos dados em *C. mydas* são compatíveis com a resposta induzida pelo estresse provocado pelo método de captura, estimulando a liberação de cortisol e o consequente aumento do lactato. Ainda, quando comparadas as alterações dos níveis de cortisol e lactato, provocadas pelo estresse de captura ou pela presença de doença, as respostas foram equivalentes entre si. Nossos dados revelam ainda, que animais portadores de fibropapilomatose apresentam maior frequência de eritrócitos micronucleados quando comparados com indivíduos saudáveis, e quando o teste de micronúcleo é utilizado para comparar ambientes de diferentes qualidades, indivíduos de ambientes mais poluídos revelam maior ocorrência de eritrócitos micronucleados. Na PCR, 100% dos tumores e 20% das amostras de sangue dos animais do grupo G4 foram positivos para ChHV 5 e todos os animais do grupo G5 foram negativos. Dessa forma, podemos concluir que não se pode utilizar a PCR para ChHV 5 no sangue total como marcador tumoral e para tanto podemos sugerir que uma análise quantitativa do DNA viral no sangue circulante, via PCR em tempo real, pode ser o próximo passo para estabelecer se a viremia é realmente constante nos animais acometidos pela fibropapilomatose.

Palavras-chave: Estresse, cortisol, tartaruga verde, fibropapiloma e conservação.

ABSTRACT

The use of biomarkers has been proposed as a sensitive tool to warn of biological and chemical stress due to pollution effects, the main feature, the fact that their assessment and quantification can be used predictively to future changes, which may reflect the high levels of biological organization, population, community or ecosystem. The aim of this study was to identify biomarkers related to stress and the development of fibropapillomas in green turtles (*Chelonia mydas*). For this, we evaluated the responses caused by stress on plasma levels of glucose, lactate and cortisol in turtles subjected to two distinct processes capture and containment, and also in two different health conditions, with and without fibropapillomatosis. Also tested whether chromosomal defects, viewed through the micronucleus test in erythrocytes, were related to different localities of anthropogenic activities and groups affected or not by fibropapillomatosis individuals. Finally, we tested whether the presence of Chelonid herpesvirus 5 in blood samples occurs with the same frequency in tumor tissues, thus representing an important biomarker for the diagnosis of fibropapillomatosis. Our sample consisted of 5 experimental groups (G1, G2, G3, G4 and G5), totaling 180 animals. The G1 was composed of 34 animals without any sign of fibropapiloma and caught in a federal conservation area in Fernando de Noronha/PE. G2, G3, G4 and G5 groups were formed by animals trapped in an effluent of Steel Company in Vitoria/ES, and G2 was composed of 66 animals without signs of fibropapillomas, G3 was composed of 40 animals with fibropapillomas. The G4 group consists of 20 animals with fibropapillomas and group G5 20 without fibropapillomatosis, and both groups were unique to the molecular analyzes. All animals were captured as juveniles like proposed by Hirth (1997). Of the 180 specimens in our sample, only the turtles G3 (n=40) and G4 (n=20) collected in Vitória/ES, 33.33 % of the total sample had fibropapillomas, in different degrees. We found that the values of plasma levels of cortisol and lactate were more elevated in G1 compared to G2. In contrast, plasma glucose levels were significantly lower in G1 compared to G2. Our data on *C. mydas* are compatible with the induced stress caused by capture method, stimulating the release of cortisol and consequent increase in the lactate response. Still, when compared changes in levels of cortisol and lactate, caused by the stress of capture or the presence of disease, responses were equivalent to each other. Our data also shows that animals with fibropapillomatosis an increased frequency of micronucleated erythrocytes when compared with healthy subjects, and when the micronucleus test is used to compare different qualities environments, individuals most polluted environments show a higher incidence of micronucleated erythrocytes. In PCR, 100 % of tumors and 60 % of the blood samples of the animals were positive for G4 ChHV 5 and all the animals of the G5 group were negative. This was, we suggest that a quantitative analysis of viral DNA in circulating blood, by real-time PCR, could be the next step to determine whether viremia is really constant in animals affected by fibropapillomatosis.

Keywords: Stress, cortisol, green turtle, fibropapiloma and conservation.

1. INTRODUÇÃO

Os biomarcadores podem ser definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou fisiológicas nas células, fluidos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativos da exposição ou efeito de um agente xenobiótico, infeccioso ou estressor (LAM e GRAY, 2003; GUERLET *et al.*, 2007).

O estresse é um processo que pode ocorrer em resposta a fatores físicos ou psicológicos, levando a uma desestruturação orgânica do indivíduo, deixando-o mais susceptível à enfermidades. A captura e o manejo de animais silvestres no ambiente natural podem constituir sérios fatores de estresse, do mesmo modo, alterações do ambiente aquático como a redução do oxigênio dissolvido, variações de pH, de temperatura ou excesso de poluentes também atuam como fatores de estresse para os animais (HAMANN *et al.*, 2006). Como resultado ao estresse, ocorre uma hiperatividade da camada cortical adrenal e um consequente aumento da concentração plasmática de corticosteróides, que inibem em parte, a resposta inflamatória e a resposta imune (NEAVE, 2008).

A resposta de corticosteróides varia entre as diferentes espécies animais e tipos de estresse, entretanto, os efeitos mais imediatos do estresse estão relacionados às variações da concentração plasmática de cortisol, lactato, glicose (PEREIRA *et al.*, 2012; THOMSON e HEITAUS, 2014) e do quadro hematológico (AGUIRRE *et al.*, 1995). O uso de biomarcadores tem sido proposto como uma ferramenta sensível para alertar sobre os efeitos biológicos decorrentes do estresse, tendo como principal característica, o fato de que sua avaliação e quantificação serem utilizadas de maneira preditiva a mudanças futuras, podendo refletir nos altos níveis de organização biológica, isto é, população, comunidade ou ecossistema (FREIRE *et al.*, 2008).

Dentre as espécies aquáticas que podem ser utilizadas como sentinelas no monitoramento de ambientes, as tartarugas marinhas são consideradas excelentes indicadores da saúde ambiental, uma vez que são animais de vida longa, respiram ar e são vertebrados marinhos que ocupam a interface ar-água, recebendo o impacto da carga ambiental, tanto na sua alimentação marinha como na inspiração de voláteis tóxicos (AGUIRRE e LUTZ, 2004).

O conhecimento do estado de saúde das espécies sentinelas é importante para o desenvolvimento de programas de conservação (SILVA *et al.*, 2014). O desenvolvimento das regiões costeiras está exercendo crescente impacto sobre os ecossistemas costeiros, levando

por vezes a exclusão ou a extinção de espécies (DASZAK *et al.*, 2000; WORM *et al.*, 2006), sendo que as tartarugas da espécie *Chelonia mydas*, conhecida também por tartaruga-verde fazem uso dessa região, principalmente para alimentação durante a fase juvenil. Além de ameaças antropogênicas, doenças como a fibropapilomatose podem representar ameaças adicionais para as tartarugas-verdes, dificultando a respiração e a mobilidade (HERBST, 1994; AGUIRRE *et al.*, 1998).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância do uso de biomarcadores

O uso de biomarcadores medidos ao nível celular, bioquímico ou molecular tem sido proposto como uma ferramenta sensível de alerta para os efeitos biológicos medidos em avaliações da qualidade ambiental (CAJARAVILLE *et al.* 2000; BARSIENE *et al.*; 2006). Uma das características mais importantes dos biomarcadores é que sua avaliação pode antecipar a identificação de mudanças nos altos níveis de organização biológica, isto é, população, comunidade ou ecossistema. Antes da morte ou da doença se manifestar, organismos podem responder ao estresse, através de alterações bioquímicas, hormonais, moleculares ou celulares (MONSERRAT *et al.* 2003). Desta forma, os biomarcadores podem ser usados de forma preditiva, permitindo que sejam tomadas ações de biorremediação antes que ocorram danos ambientais irreversíveis com consequências ecológicas severas (CAJARAVILLE *et al.* 2000, BARSIENE *et al.*; 2006).

Estes biomarcadores são de grande importância na avaliação da exposição e dos efeitos de diferentes contaminantes, de doenças infecciosas e/ou neoplásicas ou de situações de estresse que interfiram na saúde dos indivíduos (ROSS *et al.* 2002). Alguns biomarcadores vêm sendo usados com frequência em programas de avaliação de ecossistemas aquáticos e do estresse provocado por doenças ou manejo, por possuírem metodologia bem fundamentada e de fácil desenvolvimento, gerando repostas em curto espaço de tempo, e possuindo baixo custo de análise sendo altamente sensíveis (FREIRE *et al.*, 2008).

2.2. O estresse e suas variações

De modo geral, os animais respondem a estímulos como manipulação física e traumas, com diferentes componentes de ordem neural, humoral ou metabólica, visando à manutenção

ou reposição da homeostase. Nessas situações, o estresse provoca respostas adaptativas no indivíduo, gerando alteração da função orgânica normal (BARTON e IWAMA, 1991). As alterações impostas por estes estímulos são, em geral, denominadas como resposta ao estresse (DE MOFFARTS *et al.*, 2007).

As respostas de estresse são divididas em três categorias: primária, secundária e terciária (ELSASSER *et al.*, 2000). As respostas primárias são hormonais, as secundárias são as mudanças nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, e as terciárias são o comprometimento do crescimento, mudanças no comportamento e aumento na suscetibilidade a doenças (BARTON e IWAMA 1991, MOBERG, 2000).

A primeira categoria é uma reação de alarme, que causa aumento das catecolaminas (principalmente adrenalina) e corticosteróides (principalmente cortisol). A adrenalina é um hormônio produzido na medula adrenal e liberadas abruptamente na circulação em resposta a agentes estressores, gerando uma situação classicamente denominada “reação de luta ou fuga”. O cortisol é um hormônio sintetizado na córtex adrenal de forma mais lenta, sendo liberados na circulação em minutos ou horas, e geralmente apresentam uma elevação plasmática em resposta o estresse intenso ou de longa duração (JESSOP e HAMANN, 2004). ALKINDI *et al.* (2008) ressaltam que a meia-vida das catecolaminas é menor e que a dos glicocorticóides, que por sua vez apresentam elevação mais persistente.

A segunda categoria caracteriza-se por um estado de resistência, que produz efeitos metabólicos como aumento dos batimentos cardíacos, do consumo de oxigênio, alterações na glicemia, no hematócrito e no número de leucócitos na circulação (WENDELAAR BONGA, 1997; JESSOP e HAMANN, 2004).

A terceira e última categoria é um estado de exaustão que causa a queda de desempenho e a diminuição da resistência a doenças e consequente contaminação dos animais por agentes etiológicos oportunistas, podendo levá-los à morte (BARTON e IWAMA 1991 e WENDELAAR BONGA, 1997).

Fatores como idade, disponibilidade de alimento, alterações do ambiente aquático provocados pelo excesso de poluentes, estado geral de saúde e método de captura podem influenciar na produção e liberação de adrenalina e cortisol (BARTON e IWAMA, 1991; HAMANN *et al.*, 2006). Segundo GREGORY *et al.* (1996), estudaram tartarugas marinhas da espécie *Caretta caretta*, e verificaram que em indivíduos capturados em redes e mantidos por

até 6 horas cativos, observou-se elevação significativa dos níveis de plasmáticos de cortisol após 1 hora do início da captura, com pico após 3 horas da contenção, e queda dos níveis após 6 horas do início do experimento.

GREGORY (1994) descreve uma relação positiva entre os níveis plasmáticos de cortisol e os estresse em tartarugas marinhas das espécies *Caretta caretta* e *Chelonia mydas*, no entanto, não é recomendado o uso isolado desse hormônio para mensurar o efeito que o estresse pode causar (VALVERDE *et al.*, 2010), devendo ser utilizado com outros marcadores bioquímicos.

2.3. Tartarugas marinhas e os estudos sobre estresse

No Brasil são encontradas cinco espécies de tartarugas marinhas, sendo elas, *Chelonia mydas* (Tartaruga-verde), *Caretta caretta* (Tartaruga-cabeçuda), *Eretmochelys imbricata* (Tartaruga-de-pente), *Lepidochelys olivacea* (Tartaruga-oliva) e *Dermochelys coriacea* (Tartaruga-de-couro) (TAMAR, 2009). Todas estão incluídas na lista nacional de espécies ameaçadas de extinção e protegidas pela Portaria do IBAMA nº 1.522, de 19 de dezembro de 1989, redigida com base na lista mundial da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN). O Projeto TAMAR é o responsável, no Brasil, pela conservação e pesquisas sobre as tartarugas marinhas, e desde 1982 vem protegendo os principais sítios de nidificação e desde 1991 trabalhando em áreas de alimentação, combatendo os elevados níveis de captura incidental pelos pescadores locais (MARCOVALDI e MARCOVALDI, 1999).

A espécie *Chelonia mydas*, conhecida popularmente como tartaruga-verde, pertence à família Cheloniidae e está distribuída por todos os oceanos, nas zonas de águas tropicais e subtropicais e de qualquer altitude do mundo (AGUIRRE *et al.*, 1995). O nome *tartaruga-verde* deve-se à coloração esverdeada da sua gordura corporal (JACOBSON, 2007). A espécie *C. mydas* tem como característica marcante a presença de quatro pares de placas laterais não sobrepostas na carapaça. No Brasil, a carapaça dos animais adultos apresenta o comprimento curvilíneo de carapaça (CCC) médio de 115,6 cm (GROSSMAN *et al.*, 2007; MOREIRA, 2003), podendo atingir até 144 cm (MOREIRA, 2003). O peso dos adultos pode variar entre 70 e 230 kg (CUBAS e BAPTISTOTTE, 2007).

Após o nascimento, as tartarugas dessa espécie assumem uma fase pelágica (MUSICK e LIMPUS, 1997) e onívora, permanecendo em alto mar e se alimentando de diferentes tipos

de alimentos que possam ser encontrados, como algas e caramujos (GEORGE, 1997). Após atingirem a fase juvenil que, dependendo da região poderá ocorrer quando o indivíduo atingir CCC entre 20 e 25 cm, as tartarugas mudam para uma fase nerítica e predominantemente herbívora, permanecendo no litoral ou em recifes (SPOTILA, 2004).

Os oceanos tropicais e subtropicais são basicamente o local de alimentação e nidificação dessa espécie (ENCALADA *et al.*, 1996; SPOTILA, 2004), onde os juvenis tendem a permanecer durante muitos anos. Quando são encontrados em ambientes temperados, observa-se a tendência a retornarem para as áreas subtropicais durante o inverno, onde a temperatura é mais amena (MUSICK e LIMPUS, 1997). As tartarugas verdes são encontradas desde os Estados Unidos da América até a América do Sul, habitando assim, o oceano Atlântico (SPOTILA, 2004). Indivíduos juvenis e adultos são encontrados em áreas de alimentação ao longo de praticamente toda costa brasileira (BAPTISTOTTE, 2007).

As maiores colônias reprodutivas de *C. mydas* no Brasil se localizam na Ilha de Trindade, no estado do Espírito Santo (MOREIRA, 2003), seguida pelo Atol das Rocas, no estado do Rio Grande do Norte (BELLINI *et al.*, 1996) e pelo Arquipélago de Fernando de Noronha, no estado do Pernambuco (BELLINI *et al.*, 1996). Em contrapartida, *C. mydas* é uma espécie considerada ameaçada no Brasil (BRASIL, 2008) e no mundo (IUCN, 2006).

AGUIRRE *et al.* (1995) relatam que poluentes químicos têm sido indicados como ameaças a essa espécie, por diminuir a resistência dos indivíduos a diversos vírus, redução da energia disponível para realizar processos fisiológicos básicos, alterações na imunidade celular, e aumento da suscetibilidade a agentes infecciosos. Esses autores relatam, ainda, que por serem grandes vertebrados marinhos de vida longa e respiração aérea podem receber cargas do ambiente não apenas pela dieta, mas também através da inspiração de voláteis tóxicos.

Devido ao complexo ciclo de vida das tartarugas marinhas e de seu *status* como ameaçada de extinção, muitas ações têm sido praticadas nas últimas décadas visando a reversão do declínio populacional, o manejo orientado da espécie, assim como a identificação dos fatores de risco e ameaça a essa espécie (ROSSI, 2007). Sendo assim, mais uma vez justifica-se o uso das tartarugas marinhas como espécies sentinelas da saúde ambiental (AGUIRRE e LUTZ, 2004). Ainda segundo AGUIRRE e LUTZ (2004), dentre as vantagens de se utilizar a tartaruga marinha como espécie sentinela, a principal é o fato de serem muito vulneráveis à degradação antropogênica do ambiente e consequentemente refletirem bem o

impacto causado.

2.4. A fibropapilomatose como desencadeadora do estresse

No Brasil e no mundo, as tartarugas marinhas vêm sofrendo várias ameaças ao longo de séculos, como a destruição de habitats, poluição, pesca incidental, coleta de ovos, matança de fêmeas e, mais recentemente, uma doença epizootica denominada fibropapilomatose cutânea (BALAZS, 1991; HERBST, 1994). Essa doença é debilitante e pode ser fatal (GEORGE, 1997), representando importante ameaça à sobrevivência das tartarugas marinhas.

Segundo CUBAS e BAPTISTOTTE (2007), a fibropapilomatose se manifesta pela presença de tumores cutâneos benignos, verrucosos e de tamanho variável (HERBST, 1994). A distribuição destes tumores é aleatória, podendo acometer qualquer região da superfície corpórea, embora as lesões sejam observadas com maior frequência nas nadadeiras, pescoço e região axilar (AGUIRRE *et al.*, 1998; MASCARENHAS e IVERSON, 2008), podendo interferir na hidrodinâmica e motilidade desses animais (ROSSI, 2007). Aproximadamente 25% a 30% das tartarugas que apresentam tumores externos apresentam tumores internos (AGUIRRE e LUTZ, 2004).

A etiologia dessa doença ainda não foi totalmente esclarecida, porém, existem várias hipóteses. AGUIRRE *et al.* (1994) procuraram relacionar a fibropapilomatose com a poluição, porém, não encontraram associação entre a doença e inseticidas carbamatos, organofosforados, organoclorados, selênio e metais pesados, uma vez que tartarugas-verdes que apresentavam fibropapilomatose não apresentaram ou apresentaram níveis baixos de detecção desses contaminantes. Os tumores parecem manifestar-se mais frequentemente em ambientes de condições estressantes, assim como regiões com baixa qualidade de água e na presença de contaminantes e toxinas (FORMIA *et al.*, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2013).

A temperatura da água do ambiente, como um fator estressante que pudesse desencadear a fibropapilomatose, foi estudada por HAINES e KLEESE (1977). Neste estudo eles comprovaram que tartarugas submetidas a um aumento abrupto de temperatura ambiental de 25°C a 30°C apresentaram mais rapidamente os sinais clínicos e aumento da severidade das lesões tumorais, enquanto que tartarugas que foram submetidas a um aumento gradual de temperatura de 25°C para 30°C e subsequente diminuição gradual de temperatura a 25°C mostraram sinais e lesões semelhantes aos controles.

JACOBSON *et al.* (1991) e ROSSI (2007) ressaltam que há um consenso de que a

etiologia da fibropapilomatose em tartarugas está relacionada a vários fatores associados e não somente a um agente primário. Fatores ambientais, como radiação e agentes poluentes, podem vir a causar alterações no sistema imunológico ou causar um efeito carcinogênico (ANANTHASWAMY e PIERCEALL, 1990). HERBST (1994) demonstrou que a ocorrência da fibropapilomatose em tartarugas marinhas é frequente em ambientes onde a atividade industrial é maior. Muitos contaminantes químicos são conhecidos por causarem supressão imunológica (HERBST e KLEIN, 1995), porém, poucos são os trabalhos comparando os níveis de contaminantes químicos com a presença da doença. Sendo assim, não existem maiores evidências de que estes sejam os agentes primários da fibropapilomatose (HERBST, 1994).

O aumento da severidade da doença, determinado pelo tamanho e número de tumores, correlaciona-se com a deterioração das condições fisiológicas (WORK e BALAZS, 1999), ocasionando a elevação dos níveis plasmáticos de cortisol e sendo atribuídos ao estresse crônico e imunossupressão (AGUIRRE, 1998). Segundo SANTOS *et al.* (2006) não existem diferenças significativas entre os valores bioquímicos e hematócrito de tartarugas verdes juvenis selvagens submetidas ao estresse em decorrência da doença fibropapilomatose. Entretanto, ZWARG *et al.* (2006) mostraram dados discordantes, com um aumento nos níveis de proteínas plasmáticas em animais acometidos pela fibropapilomatose.

A hematimetria de animais severamente acometidos pela doença revela um processo de anemia não regenerativa com diminuição progressiva da contagem de linfócitos, basófilos e eosinófilos; e aumento progressivo de heterófilos e monócitos (MATUSHIMA, 2003). Em casos avançados da doença, os exames laboratoriais costumam apontar baixos níveis séricos de ferro, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, azotemia, elevação de enzimas hepáticas, acidose e desequilíbrio na proporção de cálcio e fósforo (AGUIRRE, 1998; MATUSHIMA, 2003). Pode ocorrer imunossupressão, acompanhada de bacteremia e redução dos níveis de colesterol e triglicérides (WORK *et al.*, 2003).

2.5. Respostas bioquímicas em função do estresse

Os valores bioquímicos plasmáticos podem sofrer influência de fatores fisiológicos, ecológicos, ambientais e das mais variadas doenças e condições metabólicas, como estresse e desidratação (BOLTEN e BJORNDALE, 1992; JACOBSON, 1998; WORK e BALAZS, 1999; SWIMMER, 2000).

O cortisol é frequentemente utilizado como parâmetro para classificar o estresse. A atividade do eixo hipotalâmico-hipófise-adrenal é típica na maioria dos vertebrados, influenciando, a partir do estresse, atividades metabólicas estimuladas pela adrenal (SWIMMER, 2000). Em répteis, o metabolismo aeróbio e anaeróbio é influenciado por hormônios esteróides, que controlam processos metabólicos (NEAVE, 2008). Hormônios glicocorticóides influenciam os processos fisiológicos, tais como a lipólise, gliconeogênese, liberação de lactato dos músculos (NEAVE, 2008) e aumento da concentração de glicose no sangue (FARVER, 2008). Glicocorticóides estão envolvidos no ajuste processo fisiológico em resposta a estímulos ambientais particularmente em animais submetidos a mudanças sazonais, como parte de sua história de vida, como a criação, migração e hibernação (MCEWEN e WINGFIELD, 2003).

O aumento da glicose plasmática é uma resposta comum ao estresse após a liberação de cortisol e constitui uma fonte extra de energia que possibilita ao animal superar os distúrbios causados pelo agente estressor (MCKEEVER, 2002; MCGOWAN, 2008). No entanto, os níveis plasmáticos de glicose têm poucas variações em condições fisiológicas, em função dos mecanismos homeostáticos bastante eficientes do organismo, os quais envolvem o controle endócrino sobre o glicogênio por parte da insulina e do glucagon, e sobre a gliconeogênese por parte dos glicocorticóides (GONZÁLEZ, 2006).

A função da glicose no organismo limita-se quase que exclusivamente a fornecer energia. É armazenada no fígado sob a forma de glicogênio e, quando a quantidade de cortisol se encontra aumentada, as células hepáticas convertem os aminoácidos e o glicerol em glicose, através do processo chamado de gliconeogênese. A nova glicose produzida pela gliconeogênese atua de forma a promover o aporte energético para enfrentar maior demanda ocasionada pela resposta ao estresse e promover o depósito de glicogênio no fígado, para eventuais situações em que ele volte a ser necessário (MOMMSEN *et al.*, 1999).

Embora a glicose plasmática aumente geralmente em resposta a todas as formas de estresse ou exercício, por causa dessa estimulação da gliconeogênese hepática, com a intensidade elevada e prolongada do exercício ou estresse, as concentrações de glicose diminuem em função da depleção do glicogênio hepático (GONZÁLEZ, 2006; ALKINDI *et al.*, 2008).

Segundo MOMMSEN *et al.* (1999), a hiperglicemia verificada em condições de estresse (causada inicialmente pelas catecolaminas) é originada pela glicogenólise no fígado e

mantida pelo nível aumentado do cortisol por mecanismos neoglicogênicos, sendo esta importante resposta secundária ao estresse. MAZEAUD *et al.* (1977) sugerem que este aumento no nível da glicose plasmática causado por um estresse de curta duração é devido ao efeito de catecolamina, enquanto que a manutenção dos níveis elevados da glicose, em estresse prolongado, é devido ao efeito do cortisol. Todas essas respostas visam manter uma quantidade de energia necessária para manutenção das atividades metabólicas normais e, em caso de fuga, suprir a demanda excessiva dos músculos.

O lactato é uma molécula originada do metabolismo dos glicídeos, sendo o produto final da glicose anaeróbica. Na presença suficiente de oxigênio e uma moderada taxa de glicólise, o ácido pirúvico entra no ciclo de Krebs, gerando CO₂ e H₂O. Em condições em que o ácido pirúvico é produzido em uma quantidade maior da que consiga utilizar, ou quando ocorre condição de anaerobiose, o ácido pirúvico é convertido em ácido láctico (GONZÁLEZ, 2006). Em condições normais, a maioria do lactato é produzido pelos eritrócitos, mas durante atividade física intensa, o músculo produz grandes quantidades de lactato, devido à condição insuficiente de oxigenação do músculo nessas situações (GONZÁLEZ, 2006; ALKINDI *et al.*, 2008).

O lactato não pode ser utilizado pelas células sob condições anaeróbicas e, portanto, segue para o sangue e conseqüentemente para o fígado, único órgão capaz de utilizá-lo, seja para oxidá-lo para produção de energia, seja para utilizá-lo como precursor de glicose na gliconeogênese (GONZÁLEZ, 2006). O excesso de lactato no sangue é uma indicação de que o sistema aeróbio não está sendo capaz de suprir a demanda de energia requerida para completar determinada atividade, sendo necessária a utilização de mecanismos compensatórios, como a glicólise anaeróbica (ALKINDI *et al.*, 2008). Segundo THRALL *et al.* (2012), o lactato atua como estimulador da secreção de cortisol, sendo assim, predispõe ao estresse.

Segundo WALLACE e JONES (2008), os níveis de lactato em tartarugas marinhas é um parâmetro bioquímico que fornece informações úteis de limitações fisiológicas e metabolismo energético durante o mergulho, elevando-se em situações quando a duração do mergulho vai além da capacidade aeróbica do animal. Geralmente, as tartarugas marinhas tendem a realizar mergulhos dentro de seus limites aeróbios e, assim, só utilizaria o metabolismo anaeróbico sob coação (BOSTROM e JONES, 2007). Dada essa alta capacidade aeróbica das tartarugas marinhas, os níveis de lactato podem não refletir com precisão o

esforço físico, mas podem ser indicativo do estresse envolvido por falta de oxigenação durante o mergulho ou apnéia (SWIMMER, 2000).

Alguns estudos indicam o lactato como bom marcador do metabolismo anaeróbico, desempenhando um papel importante durante a natação, porém, os resultados podem diferir entre os estudos devido a diferenças de metodologia e espécie. ANDERSON *et al.* (2012), HAMANN *et al.* (2006) e PEREIRA *et al.* (2012) relataram as concentrações sanguíneas de lactato em diferentes momentos durante o deslocamento na praia e os estágios iniciais do mergulho em filhotes de tartarugas marinhas. ANDERSON *et al.* (2012) descobriram que as concentrações de lactato no sangue de tartarugas marinhas atingiram um pico de 13 mmol/L, após 15 minutos de natação entre a praia e um recife plano e que eles foram maiores em filhotes de tartaruga verde do que em tartaruga cabeçuda. Em contrapartida, HAMANN *et al.* (2006) encontraram concentrações de lactato no sangue de filhotes de tartaruga verde de apenas 4,5 mmol/L após 30 minutos de natação, porém, após duas horas de natação encontraram valores atingindo 24 mmol/L. PEREIRA *et al.* (2012) relataram pico de 21 mmol/L em filhotes de tartarugas da espécie *Caretta caretta*, após uma hora de natação.

2.6. Respostas hematimétricas em função do estresse

Na investigação clínica de répteis, amostras sanguíneas podem ser facilmente obtidas e são de grande valor diagnóstico. Entretanto, a patologia clínica é uma área da medicina herpetológica que ainda necessita de vários estudos. Com a necessidade crescente de avaliação do estado de saúde em tartarugas marinhas, para uma possível manutenção de animais saudáveis em cativeiro e reabilitação de indivíduos de vida livre, se faz necessário um maior empenho em desenvolver estudos relacionados aos meios auxiliares de diagnóstico clínico, onde a avaliação hematológica possui grande destaque (PIRES *et al.*, 2009).

Dentre os parâmetros hematimétricos mensurados em tartarugas marinhas, destacam-se os eritrócitos, hemoglobina, trombócitos e leucócitos (THRALL *et al.*, 2012). Existem cinco tipos de leucócitos: heterófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos (WORK *et al.*, 1998). Dentre eles, os leucócitos são divididos em agranulócitos (linfócitos e os monócitos, sem granulações visíveis no citoplasma) e os granulócitos (heterófilos, basófilos e eosinófilos, citoplasmas apresentam granulações visíveis com diferentes afinidades pelos corantes de Romanowsky). A principal função dos leucócitos é a defesa do organismo contra a ação patogênica (JAIN, 1993). Os granulócitos apresentam atividade fagocitária, estando intimamente relacionados com mecanismos de defesa do hospedeiro. Dentre os agranulócitos,

os monócitos também apresentam marcada atividade fagocitária, enquanto os linfócitos estão relacionados com a síntese de anticorpos (THRALL *et al.*, 2012).

Segundo SANTOS *et al.* (2009), a determinação de valores hematimétricos tem sido utilizada como ferramenta de avaliação da saúde dos animais. Estudos hematológicos comparativos de animais doentes e sadios podem gerar informações importantes para o manejo e conservação das espécies. Assim como os valores bioquímicos, os valores hematimétricos podem sofrer influência de fatores fisiológicos, ambientais, de doenças e de condições metabólicas como estresse e desidratação (SWIMMER, 2000).

Estudos realizados com tartarugas verdes acometidas pela fibropapilomatose indicaram que estes animais possuíam diminuição no número de linfócitos, eosinófilos e basófilos, aumento de heterófilos e monócitos e hipoproteïnemia (CRAY *et al.*, 2001). Resultados similares foram obtidos por WORK e BALAZS (1999) na região do Havaí, sendo observada uma diminuição progressiva de linfócitos e eosinófilos e aumento progressivo de heterófilos conforme o aumento da gravidade da doença; os basófilos apresentaram pouca variação e os monócitos foram encontrados em maior número nos animais mais acometidos pela doença. O aumento do número de monócitos pode ser atribuído pela inflamação crônica causada pela severidade do tumor. A heterofilia e a linfopenia foram atribuídas pelo estresse e imunossupressão causados pela fibropapilomatose. Além disso, os animais acometidos podem apresentar anemia não regenerativa devido à cronicidade da enfermidade (ROSSI, 2007).

O cortisol, em condição de estresse, induz uma elevação leve a moderada do número de heterófilos circulantes (heterofilia), variando conforme a espécie. A heterofilia é causada principalmente pelo aumento na liberação de heterófilos da medula óssea, mas também ocorre devido à menor migração dos heterófilos da circulação para os tecidos, assim como à diminuição da aderência dos heterófilos, com consequente desvio do *pool* marginal para o *pool* circulante (THRALL *et al.*, 2012).

A diminuição dos linfócitos circulantes (linfopenia) ocorre principalmente por linfólise das células T sensíveis aos corticosteróides e por marginação ou sequestro dos linfócitos em locais extravasculares. A eosinopenia ocorre por diminuição da liberação pela medula óssea em função da interferência da ação quimiotática da histamina nos eosinófilos. O mecanismo da monocitose permanece desconhecido (JAIN, 1993).

2.7. Teste do micronúcleo eritrocitário e carcinogênese

Atualmente, tem-se encontrado uma forte relação entre a exposição a agentes genotóxicos e o desenvolvimento de diversos efeitos nocivos à saúde. É crescente a preocupação com o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas a essas situações, acidentalmente ou não, pelo fato de que a ação mutagênica por vezes se manifesta, somente após muitos anos, com o aumento da incidência de cânceres ou malformações congênitas, caracterizando os chamados efeitos cumulativos (FLORES e YAMAGUCHI, 2009). Muitos dos compostos químicos lançados em ambientes aquáticos são genotóxicos, podendo causar mutagênese e até mesmo carcinogênese (OHE *et al.*, 2004).

Micronúcleos são formados por fragmentos de cromossomos acêntricos (efeito clastogênico) ou por cromossomos inteiros que não completaram a migração anafásica da divisão celular (efeito aneugênico), deixando de ser incorporados ao núcleo das células-filhas durante a mitose (PANTALEAO *et al.*, 2006). Estes pequenos fragmentos de cromatina (Figura 1), separados do aglomerado principal, permanecerão satélites durante toda a vida da célula e indicam quebra cromossômica ou disfunções do fuso mitótico, associadas pela ação de compostos tóxicos (BOLOGNESI *et al.*, 2006).

Nesse contexto, o teste de micronúcleo tem sido utilizado como um teste rápido e confiável em detectar os danos provocados exposição a compostos químicos lançados em ambientes aquáticos (FLORES e YAMAGUCHI, 2009). Além disso, esse tipo de teste tem sido amplamente utilizado em programas de biomonitoramento sendo uma valiosa ferramenta para avaliar exposições de organismos (SOUZA *et al.*, 2004).

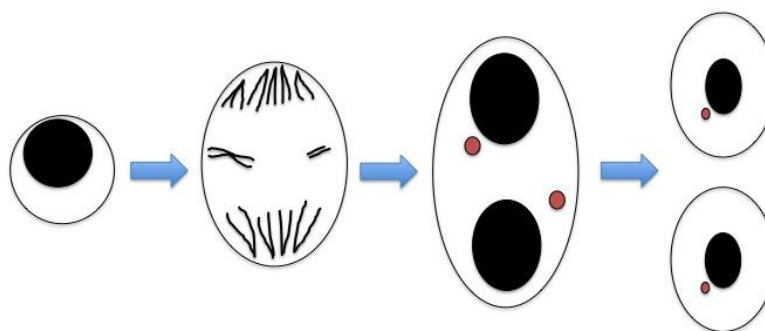


Figura 1. Expressão do micronúcleo na hemácia em divisão, demonstrando a origem a partir do revestimento de cromossomos inteiros e de fragmentos de cromossomos acêntricos de uma célula em anáfase. Fonte: Modificado de FENECH *et al.* (2005).

Os eritrócitos periféricos têm sido mais comumente utilizados para detecção do micronúcleo, pois evitam a complexidade associada aos procedimentos de preparação celular e sacrifício do animal. Além disso, a elevada taxa mitótica dos tecidos hematopoiéticos revela uma resposta rápida à exposição genotóxica, revelando os danos cromossômicos causados por esta exposição (BOLOGNESI *et al.*, 2006).

A relação entre o micronúcleo e o desenvolvimento de neoplasias é apoiada por inúmeras observações no homem e em outros vertebrados, tais como, frequência maior desse biomarcador em indivíduos com neoplasias não tratadas e em indivíduos que apresentam doenças congênitas predisponentes ao câncer (FENECH *et al.*, 2005); a correlação existente entre agentes genotóxicos indutores de micronúcleos e carcinogênese, como radiação ionizante e ultravioleta (CHANG, 1997) e a correlação inversa entre a frequência de micronúcleos e a concentração sanguínea e/ou dieta rica de certos micronutrientes associados ao risco reduzido de câncer, tais como folato, cálcio, vitamina E e ácido nicotínico (FENECH *et al.*, 2005).

Agentes quimiopreventivos e inibidores de carcinogênese podem ser avaliados pelo teste do micronúcleo (MATSUMOTO *et al.*, 2006). A capacidade quimiopreventiva e antimutagênica do extrato de *ginseng* foi analisada por PANWAR *et al.* (2005) em ratos albinos. A administração oral de diferentes doses do extrato de *ginseng* ocorreu antes da indução de tumores de pele nos animais. Nesses grupos houve significativa redução na incidência, número, tamanho e peso dos papilomas em comparação aos animais que não receberam as doses de extrato. Também houve redução no número de células com aberrações cromossômicas e micronúcleos nos grupos que receberam o tratamento prévio.

O teste de micronúcleo também tem destaque em avaliações ecotoxicológicas (PORTO *et al.*, 2005). GAUTHIER *et al.* (1999) propuseram o uso desse teste em golfinhos para monitorar populações expostas a ambientes contaminados. CAVAS *et al.* (2005) comprovaram os efeitos genotóxicos e citotóxicos de metais pesados, como cádmio e cobre em peixes, observados também previamente em mamíferos. SWARTZ *et al.* (2003), em estudo com animais de um rio poluído por dejetos industriais, verificaram que o número de micronúcleos em células sanguíneas de tartarugas correlaciona-se positivamente com os níveis de mercúrio e Dicloro-Difenil-Tricloroetano nos tecidos dos animais. Por fim, segundo DIAS (2006), ensaios envolvendo este tipo de abordagem são bons modelos para a avaliação dos riscos da exposição a fatores ambientais e fornecem subsídios para o potencial efeito

sobre a saúde das populações residentes na mesma região e para o manejo dos animais expostos.

2.8. A fibropapilomatose, o herpesvírus e estudos moleculares

As pesquisas sobre a fibropapilomatose em tartarugas marinhas têm sugerido a etiologia viral. Muitos tipos de vírus já foram isolados em tecido neoplásico de tartarugas marinhas, dentre eles, retrovírus, adenovírus, herpesvírus, poliomavírus e papilomavírus (COBERLEY *et al.*, 2002; ENE *et al.*, 2005). Segundo CURRY *et al.* (2000), os herpesvírus são associados com diversas doenças de tartarugas marinhas, como a doença do pulmão, olhos e traquéia ("*Lung-eye-trachea disease*"), a *gray patch disease* e a fibropapilomatose.

Existem, no total, seis herpesvírus que acometem as tartarugas marinhas, todos pertencentes à família Herpesviridae. Desses, dois pertencem à subfamília Alphaherpesvirinae: o Chelonid herpesvirus 5 (ChHV 5), que é o vírus associado à fibropapilomatose, e o ChHV 6, associado à *lung-eye-trachea disease*. Os demais pertencem à família Gammaherpesvirinae, sendo chamados de ChHV 1 (associado à *gray patch disease*), ChHV 2, ChHV 3 e ChHV 4 (PRIETO-TORRES *et al.*, 2013).

Recentemente, o emprego de técnicas moleculares de diagnóstico tem auxiliado o desenvolvimento de pesquisas sobre a etiologia da fibropapilomatose. A utilização da reação de polimerase em cadeia em tecido neoplásico, sangue, secreção ocular e saliva de animais doentes têm reforçado a associação entre a fibropapilomatose e a infecção por herpesvírus (MATUSHIMA, 2003; ENE *et al.*, 2005; GREENBLATT *et al.*, 2005).

MONEZI *et al.* (2006) confirmaram a circulação do vírus na corrente sanguínea de tartarugas ao analisarem o sangue e tumores de 16 tartarugas da Base de Ubatuba do Projeto TAMAR. Eles realizaram PCR a partir de sangue extraído do seio venoso cervical e de tumores extraídos cirurgicamente e detectaram o vírus em pelo menos um tipo de amostra em 11 animais, sendo que 8 amostras de tumores e 4 de sangue foram positivas. Entretanto, nunca foi realizado um estudo maior para correlacionar a frequência do vírus encontrado nos tumores e no sangue.

Sequências de herpesvírus tem sido detectadas em fibropapilomas de tartarugas-verdes, tartarugas-cabeçudas e tartarugas-oliva no Havaí, Flórida e Costa Rica usando primers que reconhecem regiões conservadas do gene da DNA polimerase de herpesvírus e partículas

semelhantes a herpesvírus tem sido visualizadas por microscopia eletrônica (QUACKENBUSH *et al.*, 2001).

A hipótese de que o herpesvírus seja o agente etiológico da doença também tem sido constatada pelos resultados obtidos em inquéritos sorológicos de animais doentes (HERBST *et al.*, 1998; COBERLEY *et al.*, 2002). HERBST *et al.* (1998) desenvolveram um ensaio imunoenzimático (ELISA) para detectar anticorpos 7S específicos contra a glicoproteína H do CFPHV, após a expressão em um baculovírus. A monitoria sorológica de animais negativos e experimentalmente infectados apresentou 100% de especificidade, embora o tempo necessário para a soroconversão de muitos animais tenha sido extenso. Apesar da baixa sensibilidade deste teste, os dados de monitoramento sorológico com tartarugas procedentes da Flórida (USA) indicaram uma prevalência de 80%.

Muitas são as formas de disseminação do herpesvírus entre tartarugas. As sanguessugas marinhas da espécie *Ozobranchus* são um potencial vetor de transmissão do herpesvírus uma vez que podem carrear o DNA viral. Alguns exemplares podem apresentar até 10 milhões de cópias do DNA viral por sanguessuga (GREENBLATT *et al.*, 2004).

Por fim, o aumento da prevalência de fibropapilomas em tartarugas marinhas, causando surtos em novas áreas geográficas, tem levantado algumas hipóteses, dentre elas, a introdução do herpesvírus associado a fibropapilomas em populações de tartarugas; uma interação entre o vírus e fatores ambientais, causando o desequilíbrio orgânico e o desenvolvimento dos tumores; e observações de que a doença é mais prevalente em habitats que são próximos a áreas de desenvolvimento urbano e agrícola (GREENBLATT *et al.*, 2005).

3. OBJETIVOS E METAS

O objetivo do presente estudo foi identificar potenciais biomarcadores (bioquímicos, citológicos e moleculares) de estresse e carcinogênese em tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas*, partindo-se da premissa de que a antecipação das mudanças patológicas pode representar uma importante estratégia para a conservação da espécie. Para tanto pretendeu-se utilizar uma fonte de material biológico proveniente de sangue, reconhecido como o método menos invasivo e rápido para obtenção de amostras de tecidos.

Para tal objetivo foram traçadas as seguintes metas:

- avaliar as respostas bioquímicas e hormonais provocadas pelo estresse decorrente de contenção e manejo em tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas*, submetidas a dois processos distintos de captura e contenção, em tartarugas de com duas condições de saúde distintas, com e sem fibropapilomatose;
- verificar a ocorrência de defeitos cromossômiais (teste de micronúcleo eritrocitário) em tartarugas de duas localidades com históricos distintos de ação antropogênica, afetados ou não pela fibropapilomatose;
- verificar a congruência da presença do DNA do herpesvirus *Chelonid herpesvirus 5* no sangue de animais via reação em cadeia da polimerase (PCR) com a presença de massas tumorais da fibropapilomatose.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Áreas de estudo

Para o estudo, foram escolhidas duas áreas cujo atividade desenvolvida pelas tartarugas no local é semelhante, sendo uma área próxima à descarga de dejetos industriais e outra inserida dentro de uma Unidade de Conservação.

A área localizada na Baía do Sueste no Arquipélago de Fernando de Noronha (área FN-PE), estado de Pernambuco ($3^{\circ}51'26''\text{S}$ e $32^{\circ}25'33''\text{O}$) possui duas Unidades de Conservação Federais, uma Área de Proteção Ambiental (APA) e o Parque Nacional Marinho (Figura 3. C-D). Abriga uma importante área de alimentação para duas espécies de tartarugas *Eretmochelys imbricata* e *Chelonia mydas* (BELLINI, 1996) e de desova para *C. mydas* (BABPTISTOTTE, 2007). Além disso, de acordo com HORTA *et al.* (2001), o arquipélago apresenta uma comunidade de algas com composição potencialmente semelhante às encontradas no Espírito Santo.

A área próxima à indústria (área VIT-ES) localizada no efluente final da Siderúrgica Arcelor Mittal Tubarão (Figura 4. A-C), no município de Vitória, Espírito Santo ($20^{\circ}15'49''\text{S}$ e $40^{\circ}13'43''\text{O}$). É um canal artificial, construído para capturar a água do mar para arrefecimento nas unidades operacionais da indústria, a uma vazão de 28 a 32 mil m^3/hora , ocasionando uma elevação de $8,75^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1,15^{\circ}\text{C}$) da temperatura média da água no local, além disso, recebe o esgoto doméstico de aproximadamente 7.000 pessoas, além do esgoto industrial, após tratamento (TOREZANI *et al.*, 2009). A alta temperatura da água e a riqueza de matéria orgânica favorecem o crescimento de algas e, talvez por essa razão, as tartarugas entrem no canal em grande numero para se alimentar, o que facilita a captura e o estudo da agregação (SANTOS, 2005). Os locais de captura foram distribuídos na região e divididos em quatro pontos seguindo uma ordem até a desembocadura no mar, sendo denominados A, B, C e D em ambos os lados do efluente. Esse efluente tem extensão de 500 metros e aproximadamente 33 metros de largura, com uma profundidade media de 2 metros.

4.2. Método de captura

O método de captura foi diferenciado nas duas áreas, em função da quantidade de animais agrupados e pelo tamanho da área onde os animais se concentravam.

Na área FN-PE, pelo fato dos animais estarem em mar aberto, a captura manual teve perseguição contínua, prolongada, sendo necessário um tempo de mergulho e perseguição superior a 60 minutos, até a completa captura do indivíduo e seu transporte para a praia. Durante esse período de perseguição, a captura era concretizada quando os indivíduos, desgastados pela fuga, subiam à superfície para respirar e não tinham condições de fugir da captura. Após a captura o animal foi levado à praia para coleta de sangue, anilhamento, biometria e posterior soltura.

Na área VIT-ES, pelo fato dos animais estarem agregados no canal do efluente, a captura foi realizada pelo uso da tarrafa, e esse processo envolveu surpresa ao animal, sem perseguição.

Todos os animais capturados e sem identificação foram devidamente anilhados. De todos os indivíduos capturados foram obtidos dados do tamanho da carapaça, em centímetros (comprimento curvilíneo de carapaça, CCC) e peso, em gramas, para caracterização da idade do animal (Figuras 3.I-J). De todos os exemplares capturados foi realizada a coleta de sangue (Figuras 3.L). Os animais recapturados foram avaliados, medidos, pesados e liberados sem nova coleta de sangue. O sexo dos animais não foi determinado devido à ausência de dimorfismo sexual externo nessa fase do ciclo de vida.

4.3. Amostra

Nossa amostra é composta por cinco grupos, totalizando 180 animais (Tabela 1).

Grupo 1 - G1

É formado por 34 indivíduos, capturados no período de 5 a 30 de Janeiro de 2011 na Baía do Sueste no Arquipélago de Fernando de Noronha. Os animais desse grupo não apresentaram fibropapilomas aparentes. De todos os indivíduos desse grupo foram colhidas amostras de sangue em heparina de lítio e feito o esfregaço sanguíneo para estudos bioquímicos e hematológicos.

Grupo 2 - G2

É formado por 66 indivíduos, capturados entre o período de 5 de novembro a 20 de dezembro de 2010 no efluente final da Siderúrgica Arcelor Mittal Tubarão, no município de Vitória, Espírito Santo. Os animais desse grupo não apresentaram fibropapilomas aparentes. De todos os indivíduos desse grupo foram colhidas amostras de sangue em heparina de lítio para estudos bioquímicos e hematológicos e feito o esfregaço sanguíneo.

Grupo 3 - G3

É formado por 40 indivíduos, capturados entre o período de 5 de novembro a 20 de dezembro de 2010 no efluente final da Siderúrgica Arcelor Mittal Tubarão, no município de Vitória, Espírito Santo. Os animais desse grupo apresentaram algum grau de fibropapilomatose aparente. De todos os indivíduos desse grupo foram colhidas amostras de sangue em heparina de lítio para estudos bioquímicos e hematológicos e feito o esfregaço sanguíneo.

Grupo 4 - G4

É formado por 20 indivíduos, capturados entre o período de 2 de maio a 15 de maio de 2013 no efluente final da Siderúrgica Arcelor Mittal Tubarão, no município de Vitória, Espírito Santo. Os animais desse grupo apresentaram algum grau de fibropapilomatose aparente. De todos os indivíduos desse grupo foram colhidas amostras de sangue em EDTA 10% e de tecido tumoral conservado em álcool 70%, para estudos moleculares e em formol a 10% para confirmação histopatológica.

Grupo 5 - G5

É formado por 20 indivíduos, capturados entre o período de 2 de maio a 15 de maio de 2013 no efluente final da Siderúrgica Arcelor Mittal Tubarão, no município de Vitória, Espírito Santo. Os animais desse grupo não apresentaram fibropapilomas aparente. De todos os indivíduos desse grupo foram colhidas amostras de sangue em EDTA 10% para estudos moleculares.

Tabela 1. Característica dos grupos de estudo (G1, G2, G3, G4 e G5) do presente estudo.

CrITÉRIOS	G1	G2	G3	G4	G5
Tempo de captura e manipulação	> 60 min	< 60 min	< 60 min	< 60 min	< 60 min
Temperatura média da água	28°C ¹	~30°C ²	~30°C ²	~30°C ²	~30°C ²
Método de captura	Perseguição	Tarrafa	Tarrafa	Tarrafa	Tarrafa
Número de animais	34	66	40	20	20
Fibropapiloma	Não	Não	Sim	Sim	Não
Localidade	Fernando de Noronha, PE	Vitória, ES	Vitória, ES	Vitória, ES	Vitória, ES

*Comprimento curvilíneo de carapaça; ¹Segundo MENDES (2006); ²Segundo TOREZANI *et al.*(2009)

4.4. Coleta de sangue e tecidos

Para coleta de sangue para os estudos bioquímicos e hematológicos (G1, G2 e G3), foi realizada a venopunção do seio venoso cervical ou veia jugular, precedido de limpeza e antissepsia adequadas com álcool iodado. O sangue foi transferido imediatamente para um tubo contendo 2 ml de heparina de lítio (Vacutainer[®]), mantido resfriado em um container de isopor com gelo até a chegada ao laboratório. O esfregaço sanguíneo para o teste de micronúcleo e hematimetria diferencial foi realizado com sangue fresco e sem anticoagulante.

A coleta de sangue para os estudos moleculares foi realizada apenas nos indivíduos dos grupos G4 e G5. A venopunção foi feita no seio venoso cervical, precedido de limpeza e antissepsia adequadas com álcool iodado. O sangue foi transferido imediatamente para um tubo contendo 2 ml de EDTA a 10% (Vacutainer[®]), mantido resfriado em um container de isopor com gelo até a chegada ao laboratório.

A coleta de tecido para os estudos moleculares foi realizada apenas nos indivíduos dos grupos G4. Em todos os animais desse grupo foram colhidas 2 amostras de tecido tumoral, uma mantida em frasco com álcool 70% e destinada às análises moleculares e outra mantida

em formol 10% e destinada ao exame histopatológico para confirmação da fibropapilomatose. As licenças para transporte e manipulação do material biológico foram concedidas pelo Sistema de autorização e informação em Biodiversidade (SISBIO) / ICMBio – IBAMA.

4.5. Análises bioquímicas e hormonais

No laboratório, o sangue acondicionado em tubo com heparina foi centrifugado durante 10 minutos a 4000 RPM, e o plasma obtido foi transferido para microtubos de 1,7 ml, para realização de exames bioquímicos e hormonais (cortisol, glicose e lactato). O plasma heparinizado foi devidamente congelado a -20°C até o processamento das amostras.

As determinações de cortisol, glicose e lactato foram realizadas no Laboratório Clínico Veterinário do Hospital Veterinário *Prof. Ricardo Alexandre Hippler* da Universidade Vila Velha, UVV (Figura 2). Os níveis plasmáticos de cortisol foram determinados utilizando kits comerciais (In Vitro Diagnóstica – Human do Brasil – Itabira, MG, Brasil) por meio de imunoensaio enzimático por competição (Mindray MR – 96A – Quibasa Química Básica Ltda - Belo Horizonte, MG, Brasil), sendo todos os testes realizados em duplicata e utilizando a média obtida das duas análises. Essa metodologia baseia-se na interação competitiva entre o cortisol e o hormônio-enzima conjugado por um número limitado de anticorpos anti-cortisol imobilizados. A intensidade de cor da reação é inversamente proporcional à quantidade de cortisol da amostra e medida através em filtro de 450nm.

Os níveis plasmáticos de glicose e lactato foram determinados através de metodologia enzimática, utilizando kit comercial (Bioclin Quibasa, Química Básica Ltda - Belo Horizonte, MG, Brasil), conforme as especificações do fabricante, sendo todos os testes realizados em duplicata, utilizando a média obtida das duas análises, em analisador bioquímico semiautomático (Bioplus - BIO 200). Para determinação da glicose plasmática foi realizada leitura de absorbância por colorimetria em filtro de comprimento de onda de 505 nm. Durante o teste, a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose-oxidase, formando um cromógeno vermelho cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose. Já a determinação do lactato plasmático foi realizada por método enzimático utilizando a lactato desidrogenase e leitura de absorbância em filtro de comprimento de onda de 340 nm.

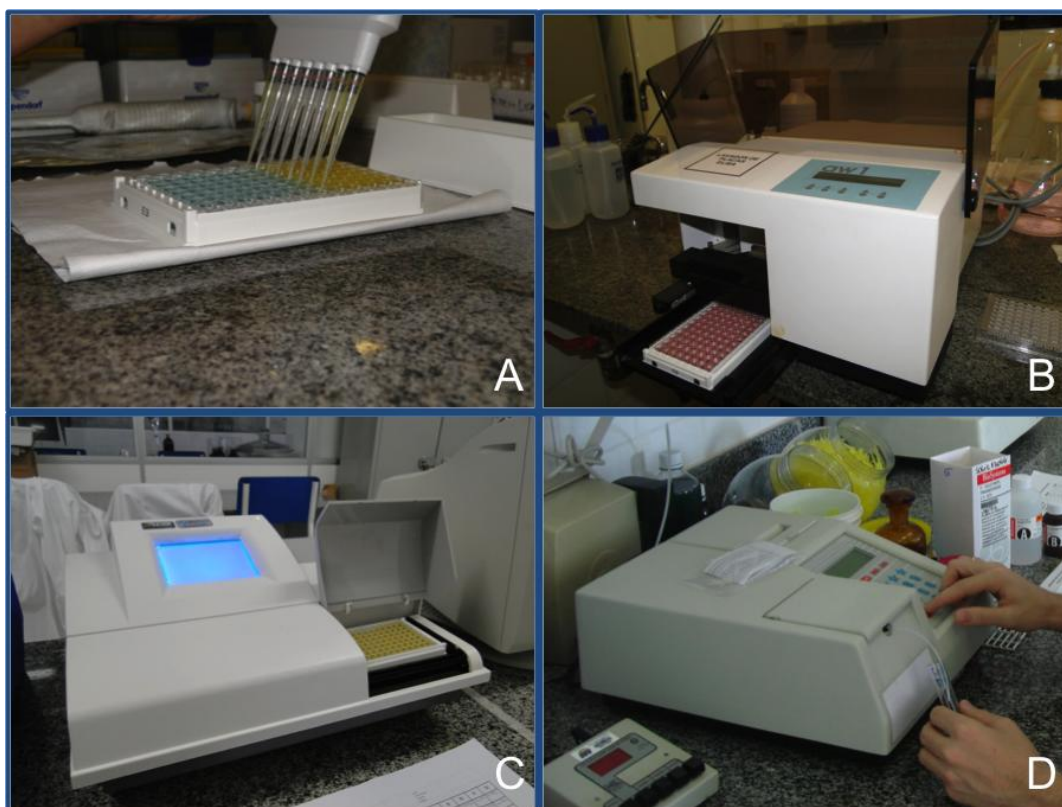


Figura 2. A. Diluição do plasma heparinizado para realização da dosagem de cortisol; B. Procedimento de lavagem em placa como procedimento prévio para o exame laboratorial; C. Leitora de ELISA para determinação das absorvâncias bioquímicas; D. Analisador semiautomático para determinação colorimétrica de glicose e lactato plasmáticos.

4.6. Análises hematológicas e teste de micronúcleo

O hemograma completo e o teste do micronúcleo eritrocitário das tartarugas capturadas foram realizados no Laboratório Clínico Veterinário do Hospital Veterinário *Professor Ricardo Alexandre Hippler* da Universidade Vila Velha (UVV), a partir de amostras colhidas em tubos contendo heparina (Vacutainer®). O hemograma completo compreende o hematócrito ou volume globular (VG), contagem de hemácias, determinação de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de leucócitos total e diferencial, contagem de trombócitos, além da determinação da proteína plasmática total. O VG foi determinado através da técnica de microhematócrito (HENDRIX, 2005), enquanto que a concentração de hemoglobina, pelo método da cianometahemoglobina, através de kit comercial (Bioclin Quibasa, Química Básica Ltda - Belo Horizonte, MG, Brasil). As contagens de eritrócitos e leucócitos foram realizadas em câmara de Neubauer, tendo como diluente a solução de NATT e HERRICK (1952). As contagens diferencial de leucócitos e de trombócitos foram estabelecidas em esfregaço sanguíneo corado segundo a técnica de Rosenfeld descrita por BIRGEL *et al.* (1983). A partir

das variáveis do eritrograma estabeleceram-se matematicamente os índices hematimétricos VCM e CHCM.

O teste do micronúcleo avalia a frequência de formação de pequenos fragmentos de cromatina. Este teste consiste na contagem de células que contenham um ou mais micronúcleos citoplasmáticos. Atualmente, os eritrócitos têm sido mais utilizados para o teste do micronúcleo, pois evitam a complexidade associada aos procedimentos de preparação celular e sacrifício do animal. Além disso, a elevada taxa mitótica dos tecidos hematopoiéticos revela uma resposta rápida à exposição genotóxica, revelando os danos cromossômicos causados por esta exposição. A lâmina de esfregaço de sangue foi corada com solução a 3% Giemsa e tampão fosfato (pH 6,8) e, em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente. A contagem de células foi realizada em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes, modelo Nikon Eclipse E-200. Foram contados 1000 eritrócitos por esfregaço sanguíneo de cada animal de cada grupo e o número de micronúcleos encontrados foi registrado. Foram considerados como micronúcleos os corpúsculos de massa de cromatina que em relação ao núcleo apresentaram aproximadamente 1/3 do seu tamanho ou menos, estando nitidamente separados, com bordas distinguíveis, mesma cor e refringência (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

4.7. Análises moleculares

O DNA das amostras de sangue total foi extraído com kit comercial (PureLink Viral RNA/DNA, Invitrogen, Life Technologies). Após a confirmação histopatológica do tecido tumoral coletado em formol 10%, a extração do DNA dos tecidos foi realizada utilizando um protocolo a partir de solução salina (BRUFORD et al., 1992, adaptado por David Vieites) (Anexo III).

As amplificações foram conduzidas em um volume final de 50µL contendo 2µL de DNA, 0,2 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Inc), 1,0 µL de dNTP, 1,25 µL de DMSO, 2,0 µL de MgCl₂, 0,2 µL dos primers específicos para o Chelonid herpesvirus 5 (5'-ACTGGCTGGCACTCAGGAAA-3' e 5'-CAGCTGCTGCTTGTCCAAAA-3') e 5µL de tampão de PCR, conforme descrito por QUACKENBUSH *et al.* (2001). Para esta reação foram usados como amostra o DNA extraído das amostras de sangue (2µL de DNA total extraído) ou do tecido tumoral (2µL de DNA diluído de 1:10 em água ultra-pura). Para cada reação foi utilizado um controle negativo. O ciclo térmico consistiu de uma desnaturação inicial a 92°C por 15 minutos, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 92°C por 45 segundos,

anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio e o tamanho do fragmento de 86pb, determinado através de um marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, USA).

4.8. Análise estatística

A análise estatística dos dados bioquímicos, hormonais e hematimétricos foi realizada através dos programas *BioEstat* v.5.3 (AYRES *et al.*, 2005) e *R* v.2.14 (R Development Core Team, 2006). Inicialmente os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e devido à distribuição não paramétrica dos dados foi utilizado para análise de variância o teste de Kruskal-Wallis, seguido de uma comparação entre grupos pelo método de Dunn (teste *post-hoc*). Considerou-se como nível de significância estatística $p < 0,05$.

Para verificar a associação entre os níveis plasmáticos de cortisol, glicose e lactato com os grupos experimentais foi realizada uma análise discriminante de regressão logística por meio de um modelo linear generalizado (GLM). Para tal definiu-se um padrão de resultado que para a associação entre as variáveis e o método de captura, foram codificados como: $Y=1$ se o nível de estresse foi elevado, e $Y=0$ se o nível de estresse foi baixo. Para a associação entre as variáveis e o estado de saúde, os resultados foram codificados como: $Y=1$ com presença de fibropapiloma, e $Y=0$ com ausência de fibropapiloma. Para a análise descritiva dos níveis de lactato, cortisol e glicose foram calculadas as médias e desvio padrão de cada parâmetro, por grupo experimental.

Para verificar a associação entre a quantidade de eritrócitos micronucleados e os grupos experimentais foi realizada uma análise discriminante de regressão logística por meio de um modelo linear generalizado (GLM). Para associação entre as variáveis e a característica do ambiente, os resultados foram codificados como: $Y=1$ ambiente com dejetos industriais, e $Y=0$ boa qualidade do ambiente sem dejetos industriais. Para a associação entre as variáveis e o a presença da fibropapilomatose, os resultados foram codificados como: $Y=1$ com presença de fibropapiloma, e $Y=0$ com ausência de fibropapiloma. Para a análise descritiva foram calculados média e desvio padrão por indivíduo e por grupo.



Figura 3. Captura dos indivíduos e coleta de dados do grupo G1, na Baía do Sueste, Fernando de Noronha; A. Base do Projeto Tamar utilizada para montagem do laboratório de campo; B. Materiais de mergulho e de coleta utilizados; C e D., local de captura das tartarugas na área 1; E-H. Captura por perseguição contínua das tartarugas; I. Identificação e anilhamento do animal capturado na praia; J. Biometria e coleta de dados do animal capturado; L. Coleta de sangue em seio venoso cervical; M. Soltura dos animais após o procedimento de coleta e obtenção dos dados.

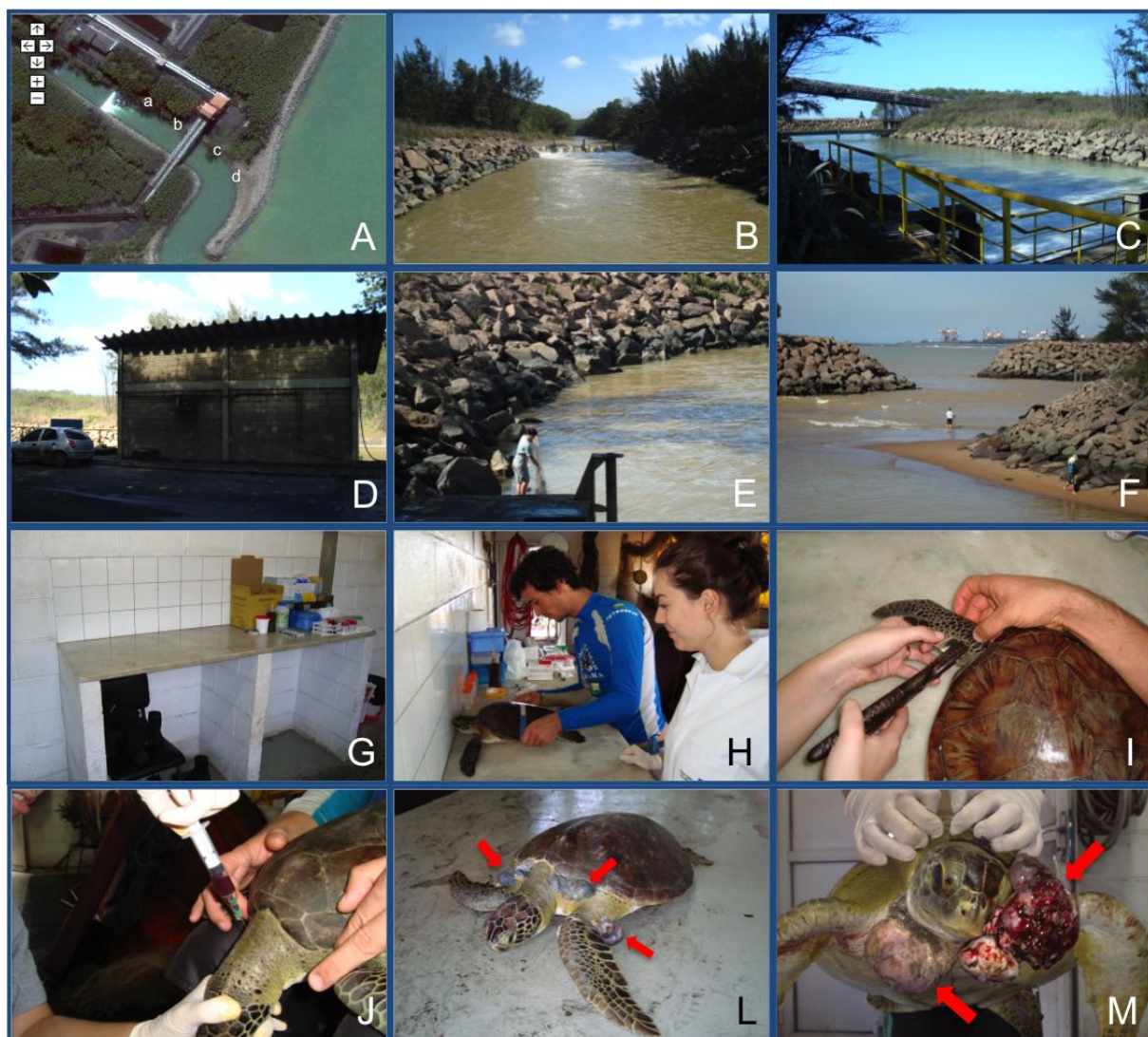


Figura 4. A-C. Local de captura do grupo G1 no Efluente final da Siderúrgica ArcelorMittal Tubarão, Vitória, ES; D. Estação de monitoramento ambiental da Siderúrgica ArcelorMittal Tubarão, Vitória, ES, onde foram manipulados os animais capturados; E-F. Captura por meio de tarrafa; G. Parte interna da Estação de monitoramento ambiental, destacando o material utilizado para biometria e coleta de material dos animais; H. Biometria do animal capturado; I. Identificação e anilhamento do animal capturado; J. Coleta de sangue em seio venoso cervical; L-M. Animais capturados com presença de fibropapilomatose (setas).

5. RESULTADOS

Todos os animais capturados eram juvenis conforme critérios propostos por HIRTH (1997), ou seja, comprimento curvilíneo de carapaça (CCC) menor que 73,5 cm. Os animais do grupo G1 (área FN-PE) apresentaram CCC variando de 28,4 a 56,3 cm, com média de $51,8 \pm 11,3$ cm, nos demais grupos, todos capturados na mesma área (VIT-ES), apresentaram CCC variando entre 25,8 e 48,1 cm, com média de $38,6 \pm 8,1$ cm.

Dos 180 exemplares da nossa amostra, somente as tartarugas do grupo G3 (n=40) e G4 (n=20) coletadas em Vitória, ES, ou seja, 33,33% da amostra total apresentaram fibropapilomas, em diferentes graus. Os demais exemplares tanto coletados em Vitória (ES, grupo G2 e G5) quanto em Fernando de Noronha (PE, grupo G1) não apresentaram tumores aparentes.

5.1. Resposta ao estresse de captura e presença de fibropapilomas

Para verificar a resposta dos animais ao estresse de captura foram realizadas análises comparativas entre os grupos G1 e G2, que diferem no tempo decorrido entre a captura e a coleta do sangue e soltura. Da mesma forma, para verificar a resposta ao estresse pela presença do fibropapiloma foram realizadas análises comparativas entre os grupos G2 e G3. Para análise comparativa foi realizada o teste não paramétrico, considerando como nível de significância estatística $p < 0,05$.

Os resultados mostram a média dos níveis plasmáticos de cortisol foi significativamente mais elevada no grupo G1 ($28,0 \pm 28,2$ ng/mL) em relação ao grupo G2 ($4,5 \pm 3,7$ ng/mL), como verificado na Tabela 2, $p < 0,05$. A mesma relação foi observada com os valores médios do nível do lactato plasmático, tendo o grupo G1 ($11,0 \pm 4,0$ mmol/L) os níveis mais elevados que o grupo G2 ($5,8 \pm 4,4$ mmol/L). Em contrapartida, a média dos níveis plasmáticos de glicose no grupo G1 foi significativamente menor ($59,7 \pm 12,1$ mg/dL) do que o grupo G2 ($71,6 \pm 10,7$ mg/dL).

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos parâmetros bioquímicos e hormonais dos indivíduos de *Chelonia mydas*, de acordo com os grupos de estudo.

Teste	Método de captura		Presença fibropapilomatose	
Grupo	FN-PE (G1) (n=34)	VIT-ES (G2) (n=66)	Ausente (G2) (n=66)	Presente (G3) (n=40)
Cortisol (ng/mL)	28,0 ± 28,2	4,6 ± 3,7	4,6 ± 3,7	22,5 ± 13,2
Glicose (mg/dL)	59,7 ± 12,1	71,6 ± 10,7	71,6 ± 10,7	71,5 ± 7,7
Lactato (mmol/L)	11,0 ± 4,0	5,8 ± 4,4	5,8 ± 4,4	8,8 ± 3,4

Valores em negrito não diferiram significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

Foi verificada uma associação entre os níveis plasmáticos de cortisol, lactato e glicose para resposta ao estresse de captura e os grupos experimentais ($p < 0,05$), e está demonstrado na figura 6, estando os resultados codificados como: $Y=1$ se o nível de estresse foi elevado, e $Y=0$ se o nível de estresse foi baixo. A alteração da resposta do cortisol foi imediata, enquanto que a resposta do lactato foi mais lenta. Para se verificar a resposta dos animais ao estresse decorrente da presença dos tumores da fibropapilomatose, foram realizadas análises comparativas entre os grupos G2 e G3, de modo a comparar indivíduos submetidos ao mesmo estresse de captura, mas que diferem entre si pela presença (Grupo G3) e ausência (grupo G2) de fibropapilomatose.

Os resultados mostram a média dos níveis plasmáticos de cortisol foi significativamente mais elevada no grupo G3 (22,5 $\pm$ 13,2 ng/mL) em relação ao grupo G2 (4,5 $\pm$ 3,7 ng/mL), como verificado na Tabela 2.2, $p < 0,05$. A mesma relação foi observada com os valores médios do nível do lactato plasmático, tendo o grupo G3 (8,8 $\pm$ 3,4 mmol/L) os níveis mais elevados que o grupo G2 (5,8 $\pm$ 4,4 mmol/L). Em contrapartida, as médias dos níveis plasmáticos de glicose não foram significativamente diferentes entre os grupos.

A associação com os grupos experimentais para resposta ao estresse em condições de saúde alterada só foi verificada com os níveis plasmáticos de cortisol ($p < 0,05$) e está demonstrado na figura 5, estando os resultados codificados como: $Y=1$ com presença de fibropapiloma, e $Y=0$ com ausência de fibropapiloma, sendo a resposta verificada no nível do cortisol similar aquela observada pelo estresse do método de captura.

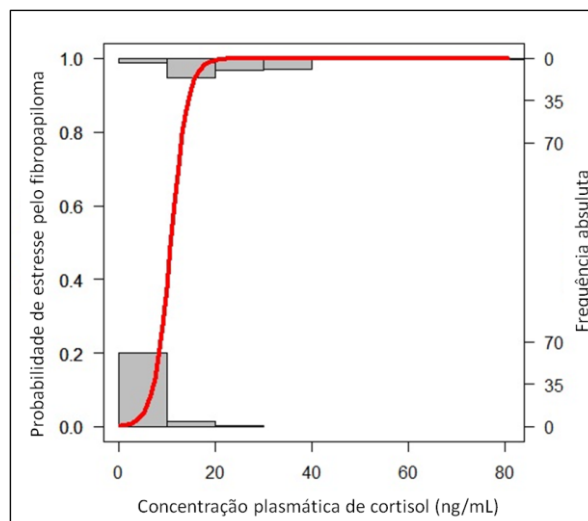


Figura 5. Gráfico da análise de regressão logística, codificando os grupos de acordo com: $Y=1$ com presença de fibropapiloma, e $Y=0$ com ausência de fibropapiloma.

5.2. Teste de micronúcleo e hemograma de acordo com a característica do ambiente

Na comparação dos resultados do teste de micronúcleo e dados hematimétricos em função da característica do ambiente, os animais do grupo G1 (FN-PE) apresentaram número significativamente menor de micronúcleos em eritrócitos ($5.000 \pm 7.000/\mu\text{L}$) do que o grupo de VIT-ES, G2 ($61.000 \pm 52.000/\mu\text{L}$), ou seja, cerca de valores superiores a 10 vezes o encontrado no grupo G1 (Tabela 3, Figura 7). Foi verificada uma associação entre a quantidade de eritrócitos com micronúcleo e os grupos experimentais ($p < 0,05$) para qualidade do ambiente, e está demonstrado na figura 8, estando os resultados codificados como: $Y=1$ ambiente com dejetos industriais, e $Y=0$ boa qualidade do ambiente sem dejetos industriais.

Em relação ao eritrograma e plaquetometria, os menores valores obtidos são de animais do FN-PE (grupo G1) em comparação aos dados da amostra de VIT-ES (grupo G2). Nos resultados obtidos no leucograma, os animais do grupo G1 (FN-PE) apresentam diferenças significativas com os de VIT-ES. No entanto, apesar das diferenças encontradas nos animais de FN-PE, os valores do eritrograma, plaquetometria, leucócitos totais, heterófilos, monócitos e eosinófilos, estão de acordo com o intervalo de referência proposto por SANTOS *et al.*, (2009) para a espécie. Ainda, os animais do grupo G1 apresentaram menores valores de linfócitos ($582 \pm 363/\mu\text{L}$), em relação ao G2 ($1075 \pm 465/\mu\text{L}$) (Figura 9).

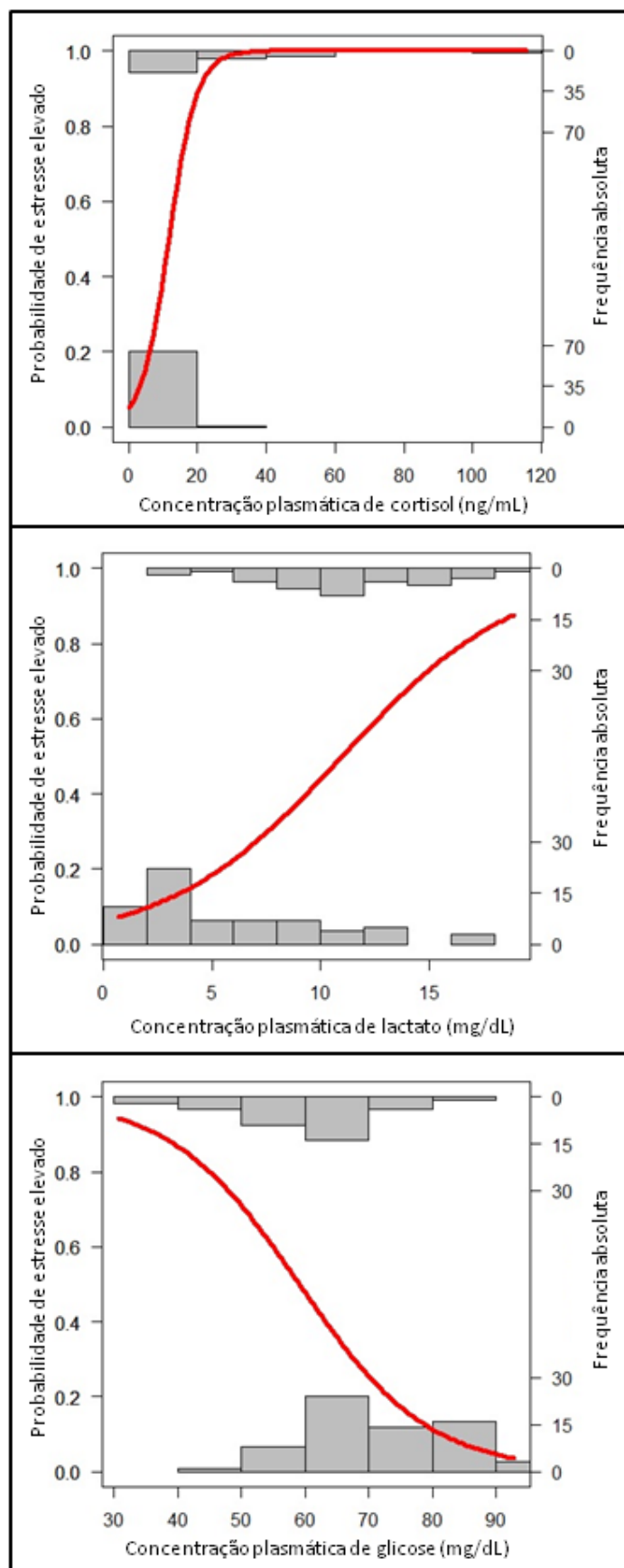


Figura 6. Gráfico da análise de regressão logística, codificando os grupos de acordo com: $Y=1$ se o nível de estresse foi elevado, e $Y=0$ se o nível de estresse foi baixo.

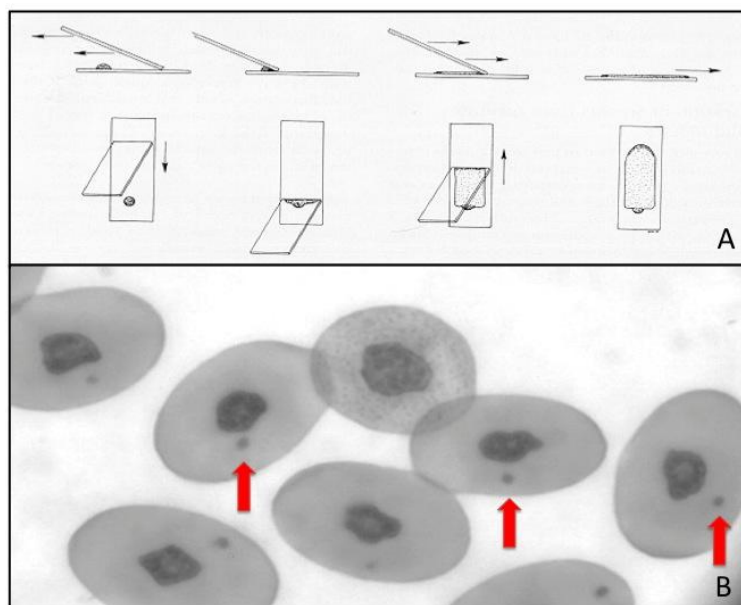


Figura 7. A. Demonstração da técnica de confecção do esfregaço sanguíneo; B. Eritrócitos micronucleados (setas) evidenciando micronúcleo em eritrócitos de tartarugas verdes.

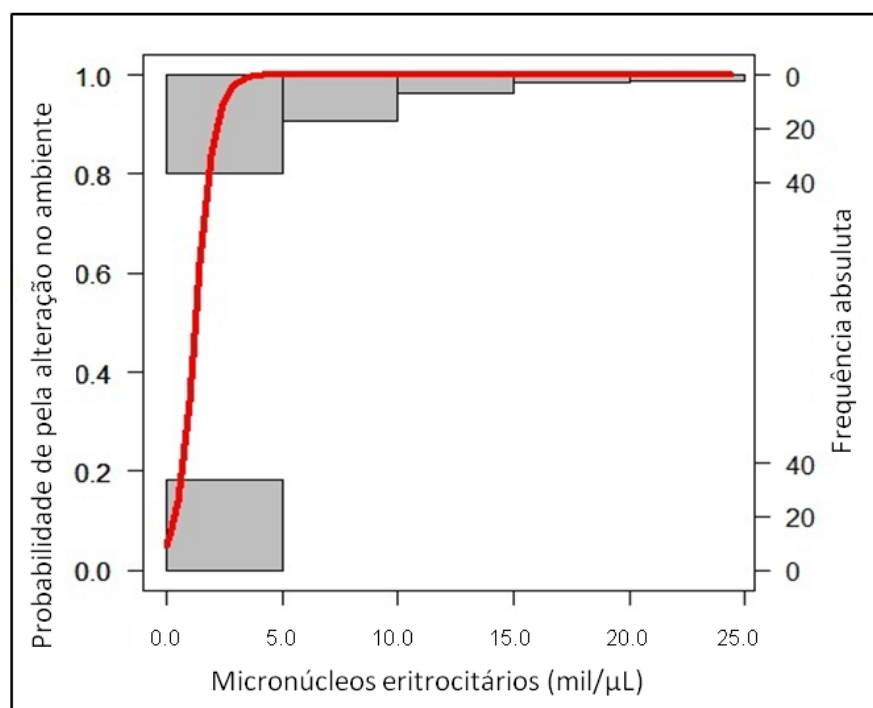


Figura 8. Gráfico da análise de regressão logística da quantidade de micronúcleo, codificando os grupos de acordo com: $Y=1$ ambiente com dejetos industriais, e $Y=0$ boa qualidade do ambiente sem dejetos industriais.

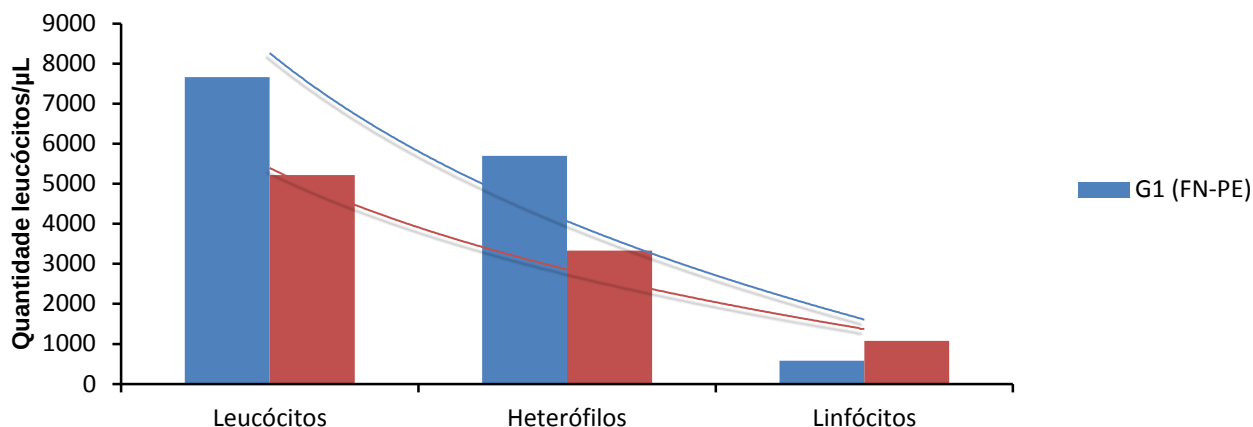


Figura 9. Demonstração do número de leucócitos totais, heterófilos e linfócitos, em função da característica do ambiente e linha de tendência.

5.3. Teste de micronúcleo e hemograma de acordo com a presença de fibropapilomas

Para avaliação a resposta da presença da fibropapilomatose nos parâmetros do teste de micronúcleo e dados hematimétricos foram comparados os dados observados entre os grupos G2 e G3, por se tratar de animais sob as mesmas condições ambientais, diferindo pela afecção de tumores da fibropapilomatose. Os valores médios de micronúcleos em eritrócitos de indivíduos do grupo G2 (VIT-ES) foram significativamente menores ($61.000 \pm 52.000/\mu\text{L}$) do que os do grupo G3 ($164.000 \pm 63.000/\mu\text{L}$), mostrando valores superiores a 2 vezes o encontrado no G2 (Tabela 3). Foi verificada uma associação entre a quantidade de eritrócitos com micronúcleo e os grupos experimentais ($p < 0,05$) para a presença da fibropapilomatose nos animais, e está demonstrado na figura 10, estando os resultados codificados como: $Y=1$ com presença de fibropapiloma, e $Y=0$ com ausência de fibropapiloma.

Em relação ao eritrograma, plaquetometria, monócitos, eosinófilos e basófilos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de VIT-ES, e todos os valores obtidos para essas análises, se encontram de acordo com o intervalo de referência proposto por ROSSI *et al.* (2007) para a espécie, quando comparada presença e ausência de fibropapilomas.

Nos resultados obtidos no leucograma (Tabela 3), os animais com fibropapilomas apresentaram os menores valores de leucócitos totais (G4: $3530 \pm 2495/\mu\text{L}$) e heterófilos (G4:

2242 $\pm$ 1654/ μ L), seguido dos animais do G2 (leucócitos totais: 4582 $\pm$ 2269/ μ L) e (heterófilos: 2921 $\pm$ 1565/ μ L), e apresentando diferença estatística significativa para os animais do G1, mas não apresentando diferença para os animais do G3.

Os animais da área FN-PE (G1) apresentaram os maiores valores de leucócitos totais, heterófilos, monócitos e eosinófilos, porém, estando de acordo com o intervalo de referência proposto por SANTOS *et al.*, (2009) para a espécie. Ainda no G1, os animais apresentaram os menores valores de linfócitos (582 $\pm$ 363/ μ L), seguido dos animais com fibropapilomas (G4: 659 $\pm$ 511/ μ L) (Figura 11).

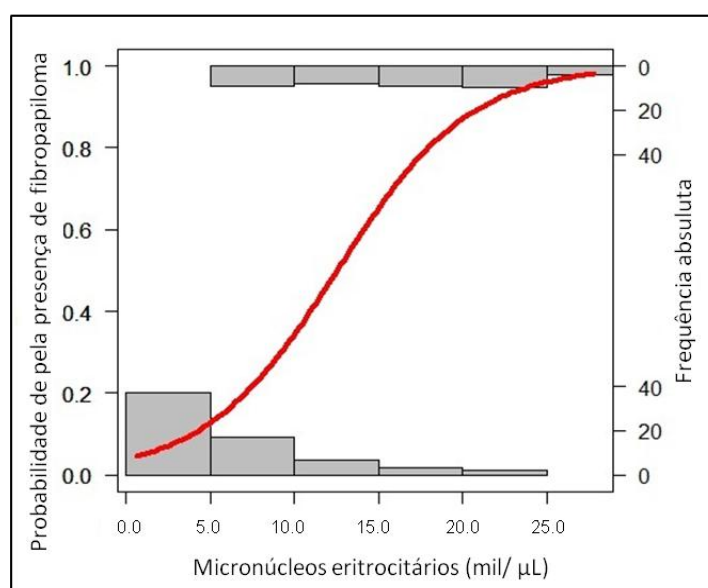


Figura 10. Gráfico da análise de regressão logística da quantidade de micronúcleo, codificando os grupos de acordo com: $Y=1$ presença de fibropapiloma, e $Y=0$ ausência de fibropapiloma.

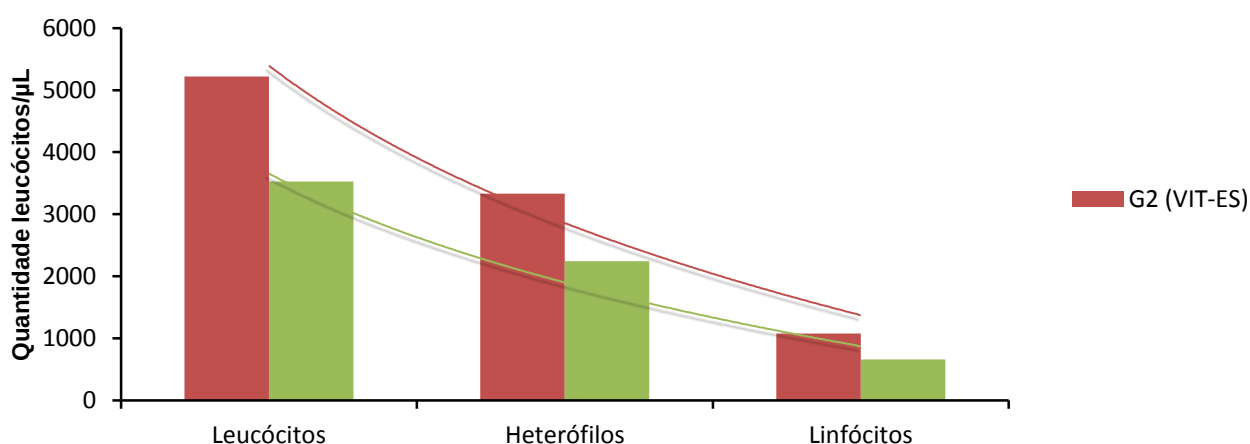


Figura 11. Demonstração do número de leucócitos totais, heterófilos e linfócitos, em função do estado de saúde e linha de tendência.

Tabela 3. Resultados da presença de micronúcleo (média por grupo + desvio padrão) em *C. mydas* de acordo com os grupos de estudo. Todos os valores diferiram significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância.

Teste	Qualidade do Ambiente		Saúde dos animais	
	FN-PE (G1) (n=34)	VIT-ES (G2) (n=66)	Sem fibropapiloma (G2) (n=66)	Com fibropapiloma (G3) (n=40)
Micronúcleo (%)	1,1 + 1,5	9,2 + 7,8	9,2 + 7,8	25,5 + 8,9
Micronúcleo (mil/μL)	5,6 + 7,6	60,8 + 52,3	60,8 + 52,3	163,8 + 63,2
Hematócrito (%)	31 + 3,5	42 + 4,5	42 + 4,5	40 + 9,2
Hemácias (mil/μL)	507 + 64	660 + 99	0,660 + 0,099	0,655 + 0,147
Hemoglobina (g/dL)	8,2 + 0,8	11,3 + 1,3	11,3 + 1,3	10,8 + 2,5
VCM (fL)	604 + 47,3	648 + 88,9	648 + 88,9	621 + 80,4
CHCM (%)	27 + 1,2	27 + 1,7	27 + 1,7	27 + 2,0
Leucócitos (/μL)	7663 + 2493	5219 + 1869	5219 + 1869	3530 + 2495
Heterófilos (/μL)	5693 + 2374	3332 + 1364	3332 + 1364	2242 + 1654
Linfócitos (/μL)	582 + 363	1075 + 465	1075 + 465	659 + 511
Monócitos (/μL)	957 + 397	669 + 379	669 + 379	443 + 353
Eosinófilos (/μL)	419 + 370	140 + 147	140 + 147	181 + 212
Basófilos (/μL)	12 + 18	3 + 11	3 + 11	5 + 11
Trombócitos (/μL)	18962 + 6533	10761 + 4237	10761 + 4237	10107 + 3409

Valores em negrito não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis, p<0,05

5.4. Teste da presença do DNA viral

Para determinação da ocorrência do Chelonid herpesvirus 5 por PCR foram utilizadas amostras de 40 indivíduos de Vit-ES, sendo 20 indivíduos com tumores dos quais obteve-se DNA de sangue total (EDTA 10%) e de tecido tumoral (grupo G4) e 20 indivíduos sem tumores dos quais obteve-se somente DNA a partir de sangue total (grupo G5). Todos os animais estavam sujeitos às mesmas condições ambientais, diferindo somente pela afecção de tumores da fibropapilomatose.

Todos os tecidos tumorais coletados foram submetidos à exame histopatológico, que evidenciou um padrão papilar, com a presença de melanócitos, hiperplasia epitelial, hiperqueratose e um halo nuclear, além da hiperplasia moderada de estroma e discariose (Figura 13), tal como descrito para fibropapilomas de tartarugas verdes capturadas no estado de São Paulo (MATUSHIMA *et al.* 2001) e no Rio Grande do Sul (RODENBUSCH, 2012).

Dos 20 animais que compõem o grupo G4, todos foram positivos para presença do DNA viral nas amostras de tecido tumoral e 2 (10%) foram positivos na PCR das amostras de sangue total (Figura 14). As reações de PCR utilizando as 20 amostras de sangue total colhidas dos animais do grupo G5 foram negativas para a presença do DNA viral. Não foi detectada amplificação em nenhum dos controles negativo.

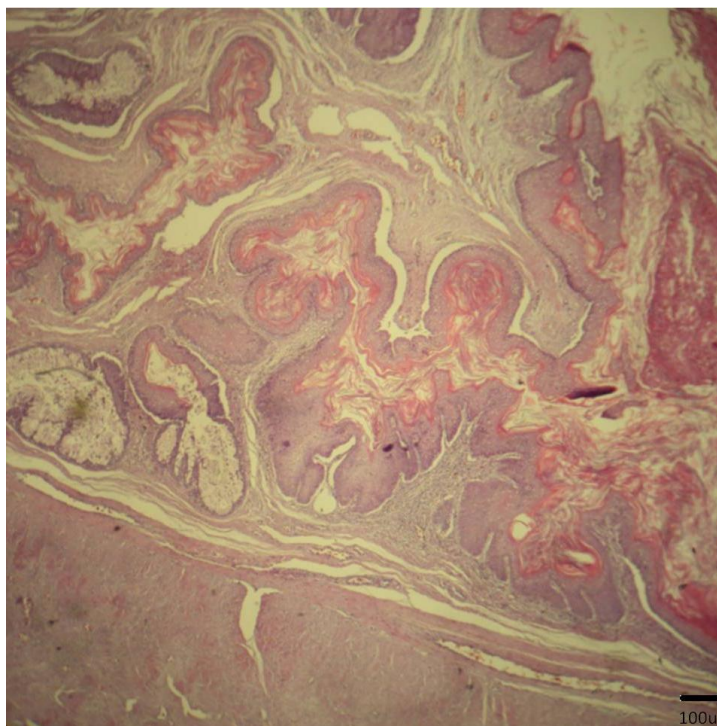


Figura 12. Corte histológico do tecido tumoral evidenciando as alterações descritas acima e que caracterizaram o fibropapiloma



Figura 13. Gel de agarose 3% demonstrando as reações de PCR para o *Chelonid Herpesvirus 5* nas massas tumorais (acima) e no sangue (abaixo) de tartarugas verdes com fibropapilomatose.

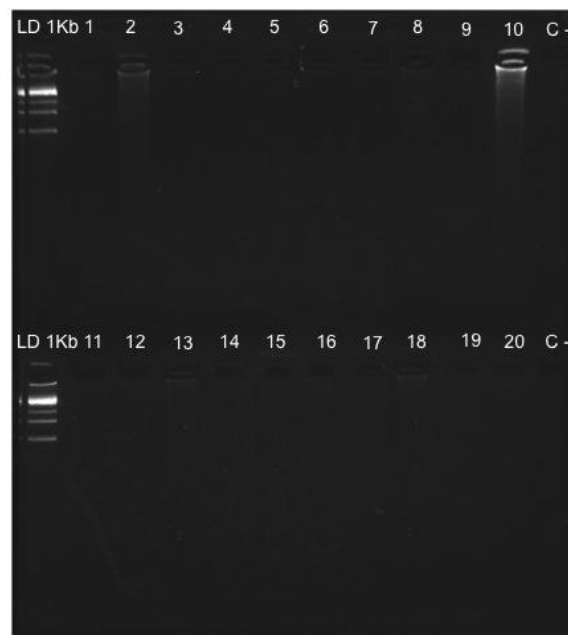


Figura 14. Gel de agarose 3% demonstrando as reações de PCR negativas para o *Chelonid Herpesvirus 5* no sangue de tartarugas verdes sem fibropapilomatose.

6. DISCUSSÃO

De acordo com ELSASSER *et al.* (2000), o estresse é o estado produzido por fatores que provocam respostas adaptativas no animal frente à alteração da função orgânica normal. Esse processo estimula a liberação de uma variedade de hormônios pela glândula adrenal, sendo utilizados em situações de diferentes níveis de estresse. As catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, são liberadas e metabolizadas imediatamente após a ocorrência do fator estressante. Devido a essa particularidade da liberação das catecolaminas, o parâmetro mais utilizado para avaliar a resposta ao estresse é o cortisol (BARTON e IWAMA, 1991).

Fatores como idade, disponibilidade de alimento, estado geral de saúde e método de captura podem influenciar na produção e liberação de adrenalina e cortisol (GONZÁLEZ, 2006). SWIMMER (2000) afirma que os valores bioquímicos plasmáticos podem sofrer influência de fatores ambientais, inclusive. A amostra utilizada no presente estudo não foi influenciada pela idade, pois todos os indivíduos dos três grupos experimentais eram juvenis, de acordo com os critérios estabelecidos por HIRTH (1997), ou seja, comprimento curvilíneo de carapaça (CCC) menor que 73,5 cm. A disponibilidade de alimento também não parece ser um fator que influenciaria a produção de cortisol, uma vez que HORTA *et al.* (2001) já haviam comparado que a comunidade de algas apresentavam composições semelhantes nos dois locais de captura utilizados em nosso estudo.

6.1. Resposta ao estresse de captura

Para se investigar a resposta primária ao estresse, em decorrência do susto ou fuga provocados pelo método de captura, foram comparados os níveis do cortisol entre os grupos G1 e G2, que se caracterizam por indivíduos sem desenvolvimento de tumores da fibropapilomatose, sujeitos a pressões pelo processo de captura e manuseio distintos. Observou-se que os níveis de cortisol dos indivíduos do grupo G1 são significativamente maiores que os do grupo G2, sugerindo que o método de captura pode ter influenciado na resposta do cortisol plasmático.

GREENBERG e WINGFIELD (1987) e JESSOP *et al.* (2004) afirmam que diferentes métodos de captura podem desencadear estresse em tartarugas-de-pente juvenis (*E. imbricata*), causando alterações fisiológicas como o aumento dos níveis plasmáticos de cortisol. Os mesmos autores afirmam ainda que, assim como na grande maioria das espécies expostas a agentes estressores, o eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal da tartaruga-de-pente é

ativado pelo estresse de captura, resultando na secreção de glicocorticóides, incluindo cortisol. As alterações impostas pela liberação de cortisol são em geral denominadas como resposta ao estresse (DE MOFFARTS *et al.*, 2007; THOMSON e HEITHAUS, 2014).

Em outro estudo, GREGORY *et al.* (1996) monitoraram os níveis plasmáticos de cortisol em tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*) capturadas em redes e mantidas por até 6 horas cativas, observando que após 1 hora do início da captura houve elevação significativa dos níveis de cortisol no sangue com pico 3 horas após a contenção e queda dos níveis após 6 horas do início do experimento.

No entanto, TYRELL e CREE (1998) relatam que, ao contrário da maioria dos outros répteis, os níveis médios de cortisol plasmático liberados no plasma e provocado pelo estresse durante o procedimento de captura de tartarugas-de-pente juvenis foi relativamente baixa, sendo inferior a 15 ng/ml, porém, não informando qual foi o método de captura utilizado. Nossos dados revelaram valores de cortisol abaixo de 10 ng/ml, com média de $4,6 \pm 3,7$ ng/ml para o grupo G2, submetido a baixo estresse de captura, comparado com média de $28,0 \pm 28,2$ ng/ml para o grupo G1, com altos níveis de estresse, valores médios aproximadamente cinco vezes superiores ao valor médio do nível do cortisol no grupo G1. Valores acima de 20 ng/ml de cortisol são compatíveis a grupo com alto estresse, como verificado no grupo G1, não sendo verificados valores intermediários de cortisol no grupo G1.

Os valores encontrados nos animais do grupo G1 quando comparados ao grupo G2, são compatíveis com os achados de GREGORY *et al.* (1996) e com o fenômeno de elevação plasmática do cortisol em resposta ao estresse intenso ou de longa duração associado ao método de captura.

Hormônios adrenocorticais e catecolaminas estimulam metabolismo anaeróbio, elevando a frequência cardíaca e o metabolismo do glicogênio por aumento da glicogenólise e gliconeogênese (ALKINDI *et al.*, 2008; LABRADA-MARTAGÓN *et al.*, 2013). Embora há décadas já esteja bem estabelecido na literatura que o aumento na atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal de humanos submetidos ao estresse seja proporcional à intensidade do mesmo, são raros os estudos com modelos animais que se preocupam com a identificação e a intensidade do estresse agudo ou crônico e sua consequente resposta. Além disso, faltam na literatura trabalhos associando a sensibilidade de diferentes biomarcadores de estresse em distintas intensidades (CONTARTEZE *et al.*, 2007).

O cortisol é um hormônio hiperglicêmico, ou seja, pode causar uma elevação da glicose plasmática cujo papel é proporcionar energia para a fuga ou enfrentamento de uma situação adversa (WENDELAAR BONGA, 1997), sendo uma resposta comum ao estresse (MCKEEVER, 2002; MCGOWAN, 2008; LABRADA-MARTAGÓN *et al.*, 2013). No entanto, os níveis plasmáticos de glicose têm poucas variações, em função dos mecanismos homeostáticos eficientes do organismo, os quais envolvem o controle endócrino por parte da insulina e do glucagon sobre o glicogênio e glicocorticóides sobre a gliconeogênese (GONZÁLEZ, 2006). A glicemia de répteis sadios varia de acordo com a espécie, o estado nutricional, as condições ambientais e o estresse (PRIETO-TORRES *et al.*, 2013). De acordo com POTTINGER *et al.* (2000), a hiperglicemia é, em geral, observada em animais expostos a algum tipo de estímulo adverso, entretanto, não se sabe ao certo em quanto tempo ocorreria um pico de glicose, após um estímulo de estresse, para tartarugas marinhas.

Quando comparamos os valores obtidos de glicose entre os grupos G1 e G2, verificamos que o grupo G1 apresentou menores valores de glicose. Considerando que o aumento de glicose, estimulado pela ação hiperglicêmica do cortisol (GONZÁLEZ, 2006) é uma resposta rápida ao estresse, e que em casos de prolongamento do efeito estressor, os níveis de glicose tendem a recuperar os valores normais, em função da homeostase (MAZEAUD *et al.*, 1977), os dados de níveis de glicose para o grupo G1 parecem estar de acordo com esse fenômeno.

Além disso, o maior desgaste energético durante o processo de captura pode explicar esses valores menores de glicose no grupo G1, concordante com um panorama de relação inversamente proporcional entre o nível de cortisol e de glicose no caso do grupo G1, em que há alto nível de estresse prolongado pela captura. Observamos assim, a perseguição ativa por períodos médios superiores a 60 minutos contribuem para utilização da glicose plasmática disponível, concordando com os achados descritos por GREGORY *et al.* (1996).

Segundo ANDERSON *et al.* (2012), além da glicose plasmática, outro bom indicador para resposta ao estresse é o lactato plasmático, pois indica o acúmulo de ácido láctico decorrente do aumento do exercício físico à medida que os indivíduos são expostos a um agente estressor. O lactato é um produto do metabolismo dos glicídeos, sendo o produto final da glicose anaeróbica. Na presença suficiente de oxigênio e uma moderada taxa de glicólise, o ácido pirúvico entra no ciclo de Krebs, gerando CO₂ e H₂O. Em condições em que o ácido pirúvico é produzido em uma quantidade maior da que consiga utilizar, ou quando ocorre

condição de anaerobiose, o ácido pirúvico é convertido em ácido láctico (GONZÁLEZ, 2006). Em condições normais, a maioria do lactato é produzido pelos eritrócitos, mas durante atividade física intensa, o músculo produz grandes quantidades de lactato, devido à condição insuficiente de oxigenação do músculo nessas situações (DELESALLE *et al.*, 2007; PRICE *et al.*, 2013).

Nossos dados mostram que o grupo G1 apresentou valores médios de lactato plasmático significativamente mais elevados ($11,0 \pm 4,0$ mmol/L) em relação ao grupo G2 ($5,8 \pm 4,4$ mmol/L), compatíveis com um panorama em que desgaste muscular e energético ocasionado pela fuga durante a captura, caracteriza uma forma de estresse, gerando um aumento do metabolismo anaeróbico e consequentemente um aumento na produção de lactato.

Os níveis de lactato aumentados em G1 estão correlacionados com os níveis aumentados de cortisol, concordando com LESSA (2003), que afirmou que o lactato atua como estimulador da secreção de cortisol, e assim, aumentados com condições de estresse. Além disso, os valores altos de lactato em G1 estão de acordo com a proposta de que a perseguição excessiva durante a captura levaria a uma situação de alta fadiga, falta de oxigênio e impossibilidade de compensação da respiração, gerando acúmulo do lactato na circulação, como mencionado por TRALL *et al.*, (2004).

Geralmente, as tartarugas marinhas tendem a realizar mergulhos dentro de seus limites aeróbios e, provavelmente, só utilizar o metabolismo anaeróbico sob coação (BOSTROM e JONES, 2007). ALKINDI *et al.* (2008) verificaram que as concentrações plasmáticas de lactato foram significativamente maiores no pós-nidificação de tartarugas capturadas, concluindo que é mais provável que as tartarugas estressadas dependem de respiração anaeróbica que resulta no aumento dos níveis de lactato.

6.2. Resposta ao estresse na presença da fibropapilomatose

Para se investigar a resposta ao estresse em condições de saúde alterada representada pelo desenvolvimento de tumores decorrentes da fibropapilomatose, comparamos os valores plasmáticos do cortisol, lactato e glicose entre os indivíduos que sofreram os mesmos níveis de estresse de captura, com ausência (grupo G2) e presença de tumores da fibropapilomatose (grupo G3).

Os valores de cortisol e lactato entre os indivíduos dos grupos G2 e G3 mostraram-se

significativamente maiores em G3 do que em G2, em valores médios cerca de 4 vezes maiores para o cortisol, e um terço maior do lactato. Os níveis de glicose não foram significativamente distintos.

O estresse ocasionado pela localização das massas tumorais nos animais com fibropapilomas no grupo G3 poderia estar associado a dificuldade de sua estabilidade corporal de nidificação, aumentando o desgaste muscular e energético, caracterizando, dessa forma, em metabolismo anaeróbico, resultando em valores aumentados de cortisol e lactato, como observado no grupo G3. Nossos dados estão de acordo com a proposta de TRALL *et al.*, (2004) de que a situação de alta fadiga em decorrência de debilidade física, associada à falta de oxigênio e impossibilidade de compensação da respiração, gerando acúmulo do lactato na circulação.

Da mesma forma, quando comparados, os indivíduos do grupo G3 apresentaram níveis mais elevados de cortisol plasmático quando comparados aos do grupo G2, apesar de terem sido capturados de forma semelhante. Dada a correlação positiva da presença do papiloma com o aumento dos valores de lactato e cortisol, acreditamos que o estresse da doença reflete em um desgaste energético e pode ser o agente causador do estresse.

De acordo com AGUIRRE *et al.* (1995) e MOORE e JESSOP (2003), o estado de saúde ou doença em indivíduos pode alterar a sensibilidade da resposta a agentes estressores, aumentando a liberação de hormônios adrenocorticais em répteis. Segundo os mesmos autores, tartarugas verdes (*C. mydas*) portadoras de fibropapilomatose grave e lagartos (*S. occidentalis*) infectados com malária aumentaram os níveis plasmáticos de cortisol de forma semelhante ao aumento provocado após o estresse de captura de indivíduos saudáveis.

Quando comparados os valores plasmáticos de cortisol e lactato entre os grupos G1 e G3, não se observou diferença significativa entre esses níveis, embora os agentes estressores tenham sido distintos, sugerindo que a resposta primária ao estresse agudo provocado pelo método de coleta é equivalente à resposta terciária ao estresse decorrente de um estado de saúde debilitado crônico nessa região de Vitória, ES. Os níveis de glicose entre G1 e G3 não são diferentes, correspondendo a uma situação em que a glicose está compatível a um cenário de homeostase decorrente do agente estressor ser crônico e lento, ou seja, uma situação de estresse prolongado decorrente da presença da fibropapilomatose.

A fibropapilomatose é uma doença debilitante, que pode provocar a morte em

tartarugas marinhas principalmente da espécie *Chelonia mydas*, representando uma importante ameaça a esta espécie (ROSSI, 2007). Os tumores podem provocar emaciação, inabilidade de natação e locomoção, impedir a apreensão de alimentos, dificultar a fuga de predadores e também prejudicar a respiração (AGUIRRE e LUTZ, 2004). Nossos dados são concordantes com os pressupostos por Rossi (2007), pois os indivíduos afetados pelos tumores estão sujeitos a condições altas de estresse prolongado.

6.3. Resposta ao estresse em diferentes condições ambientais

Outro componente passível de análise de resposta ao estresse é a condição ambiental a que os animais submetidos ao grupo G1 e grupos G2+G3 estão sujeitos. A presença da fibropapilomatose tem sido o componente discrepante entre os grupos, pois 100% dos indivíduos de Fernando de Noronha (PE) não apresentam sinais de fibropapilomatose, enquanto que 37,6% dos animais de Vitória (ES) são acometidos pela doença.

SANTOS *et al.* (2010) estudaram a relação entre a fibropapilomatose e a qualidade do ambiente nas mesmas áreas do nosso trabalho e afirmaram que a alta prevalência da fibropapilomatose, a baixa qualidade do habitat, e baixa diversidade de algas na área do efluente siderúrgico, contrastam com a ausência da doença e habitat de boa qualidade encontrada na área de preservação do parque nacional marinho de Fernando de Noronha. Estes achados vão de encontro com a hipótese de relação entre a degradação do habitat e a presença da fibropapilomatose proposta por HERBST (1994) e HERBST e KLEIN (1995).

A localidade utilizada em Vitória (ES) é o efluente final da Siderúrgica Arcelor Mittal Tubarão, no qual a vazão para água captada do mar em um ponto mais ao norte e é utilizada para arrefecimento nas unidades operacionais da indústria, além de receber esgoto doméstico de aproximadamente 7.000 pessoas e esgoto industrial, após tratamento (TOREZANI *et al.*, 2009). A alta temperatura da água e a riqueza de matéria orgânica favorecem o crescimento de algas e a aglomeração de tartarugas marinhas nessa localidade.

De acordo com SANTOS *et al.* (2010), a predominância de algas oportunistas de rápido crescimento no efluente siderúrgico podem ter um impacto nutricional sobre as tartarugas verdes durante a fase bentônica. Os autores afirmam ainda, que isso pode definir o cenário para a exposição crônica a contaminantes bioacumulados em algas ou a falta de nutrientes essenciais que poderia aumentar a susceptibilidade ou agravar o desenvolvimento da fibropapilomatose. Embora outros fatores como a imunossupressão estejam fortemente

correlacionadas com o aparecimento da doença em selvagens tartarugas verdes (WORK *et al.*, 2001), o impacto nutricional como fatores que contribuem para o aparecimento da fibropapilomatose não foi explorado, e merece uma investigação mais aprofundada (SANTOS *et al.*, 2010).

Os nossos dados de ocorrência da doença na população (37,6%) são inferiores aos encontrados por SANTOS *et al.* (2010) na mesma localidade (58,3%), no entanto, são superiores aos encontrados por BAPTISTOTTE (2007) que encontrou 15,4% dos animais portadores da doença ao longo do litoral brasileiro, entre os estados de Santa Catarina e Ceará.

AGUIRRE (1998) acompanhou a presença das tartarugas verdes no estado da Flórida desde 1975. O autor observou que, no início da década de 70, não existiam evidências da doença, mas que no final da década já havia alguns animais com a enfermidade. Durante o ano de 1985, a fibropapilomatose foi encontrada em 29% de 145 tartarugas analisadas. No período de 1989 a 1996, a prevalência da doença subiu para 44% e, no ano de 1997, 63% das tartarugas examinadas apresentavam os tumores. Além do aumento na incidência da doença, o autor também observou que a espécie *Chelonia mydas* foi a mais afetada e que 17% dos animais doentes apresentavam tumores na cavidade oral. De acordo com o autor, as manifestações clínicas da enfermidade podem variar em função do número e da localização dos tumores e do grau de comprometimento orgânico. Geralmente, as tartarugas com fibropapilomatose apresentam-se debilitadas, com caquexia (perda de peso) e dificuldade de flutuação.

Em contrapartida, a localidade utilizada em Fernando de Noronha (PE) é uma Área de Proteção Ambiental, protegida por lei e é considerada de baixo impacto antrópico e livre de poluição (SANTOS *et al.*, 2006). Até o presente momento não foram encontrados dados na literatura de animais, juvenis ou adultos, portadores da fibropapilomatose nessa localidade.

Segundo ENE *et al.* (2005), a prevalência da fibropapilomatose é maior em ambientes marinhos que sofrem com o impacto da atividade antrópica. Assim, a epidemiologia da fibropapilomatose pode ser utilizada como ferramenta para o monitoramento da saúde de ecossistemas marinhos em habitats próximos da costa (AGUIRRE e LUTZ, 2004). Os níveis de lactato e cortisol observados no presente estudo são compatíveis com níveis de alto estresse e de condições anaeróbicas em tartarugas com fibropapilomatose (grupo G3).

A temperatura da água, como um fator estressante que pudesse desencadear a fibropapilomatose, foi estudada por HAINES e KLEESE (1977). Neste estudo eles comprovaram que tartarugas submetidas a um aumento gradual de temperatura de 25°C a 30°C e subsequente permanência a 30°C; e tartarugas submetidas a um aumento abrupto de temperatura de 25°C a 30°C apresentaram uma diminuição do tempo de apresentação dos sinais clínicos e aumento da severidade das lesões tumorais, enquanto que tartarugas que foram submetidas a um aumento gradual de temperatura de 25°C para 30°C e subsequente diminuição gradual de temperatura a 25°C mostraram sinais e lesões semelhantes aos controles.

6.4. Teste de micronúcleo e hemograma em função da característica do ambiente

O papel dos poluentes químicos na saúde das tartarugas marinhas é desconhecido. Mas é importante entender o risco das contaminações para saúde e funções imunológicas das tartarugas porque esses efeitos podem gerar impacto na sobrevivência de suas populações (DAY *et al.*, 2007). Muitos poluentes químicos persistem nos tecidos das tartarugas podendo acumular durante o tempo, por isso, esses poluentes podem alcançar níveis tóxicos em espécies de longa vida e ocupar altos níveis tróficos da cadeia alimentar marinha (MEYERS-SHONEN e WALTON, 1994).

A concentração de metais pesados representa um risco e geralmente nessas espécies é determinada pela exposição ambiental (GARDNER *et al.*, 2006), mas pode variar dependendo de fatores biológicos tais como idade, sexo, hábitos de migração. O mercúrio foi identificado como uma das ameaças ambientais mais sérias para o bem estar dos animais selvagens nos Estados Unidos da América (FACEMIRE *et al.* 1995; ANDERSON *et al.*, 2012). BALAZS e POOLEY (1991) sugeriu que a contaminação do ambiente é um fator que contribui o desenvolvimento da fibropapilomatose nas tartarugas por reduzir as funções imunes. ACHE *et al.* (2000) relataram mais de 70% da prevalência desta doença na Flórida, e esses ambientes estavam com elevados níveis de mercúrio.

Por possuir hábitos herbívoros, a tartaruga verde se alimenta de microalgas, principalmente *Thalassia testudinum*. Algas têm a capacidade de acumular vários metais, com cargas milhares de vezes superiores que a concentração da água marinha (CARPENÈ *et al.*, 1995). WHELAN *et al.* (2005) encontraram uma alta concentração de cobre e manganês no tecido foliar da *T. testudinum*. Além da composição da dieta a idade também contribui para o acúmulo de metais em tecidos (ANDREANI, 2008).

Apesar do potencial genotóxico dos efluentes lançados no ambiente aquático, de acordo com HOUK (1992), apenas 2,5% dos estudos utilizam animais *in vivo* para avaliação do risco genotóxico dessas misturas complexas, sendo bem restritos os que examinam os efeitos genotóxicos da exposição direta de peixes a efluentes sob condições laboratoriais.

A genotoxicidade de efluentes de diversas origens tem sido atestada através da indução na frequência de micronúcleos em células de peixes. Em condições de bioensaio foram avaliados efluentes da indústria de papel e celulose (MARIA *et al.*, 2003), indústria têxtil (ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2003), resíduos de refinaria de petróleo e processamento de cromo (ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005), efluentes industriais e urbanos (ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2003), e *in situ*, foram avaliadas regiões fortemente impactadas por resíduos agrícolas, urbanos (ERGENE *et al.*, 2007) e industriais (GUILHERME *et al.*, 2008).

Apesar de não ter sido feito um estudo de concentração de metais pesados na água ou na composição das algas, nossos resultados evidenciaram uma ocorrência superior a 10 vezes a taxa de micronúcleos nos indivíduos de Vitória, ES quando comparados os animais de Fernando de Noronha, PE. Esses dados sugerem que a característica e qualidade da água podem interferir na ação da quebra cromossômica dos eritrócitos dos animais, ocasionando um aumento na ocorrência de micronúcleos eritrocitários.

Os animais de VIT-ES (G2 e G3), apresentaram maior número de eritrócitos micronucleados ($60.800 \pm 52.300/\mu\text{L}$ e $163800 \pm 63.200/\mu\text{L}$, respectivamente) quando comparados aos animais de FN-PE ($5.600 \pm 7.600/\mu\text{L}$), concordando com SILVA e NEPOMUCENO (2010), que afirma que existe uma correlação entre agentes genotóxicos e a taxa de micronúcleos em eritrócitos periféricos. No entanto, não foi foco do presente estudo determinar quais seriam as possíveis substâncias genotóxicas que poderiam influenciar no aumento do número de eritrócitos micronucleados.

Em estudos com pacientes humanos a avaliação dos micronúcleos é um instrumento útil também no monitoramento de indivíduos expostos a agentes genotóxicos de natureza ocupacional ou ambiental (SARTO, 1987). Indivíduos expostos ao formaldeído (TITENKO-HOLLAND, 1996), a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (KARAHALIL, 1999) e operadores de bombas de postos de combustíveis em contato com metanol (GATTAS, 2001) mostraram aumento do número de micronúcleos nas células bucais esfoliadas. CHEN (2006) demonstrou haver uma relação direta no aumento da frequência de micronúcleos e dos níveis

de ozônio em residentes de cidades com variação sazonal na proporção atmosférica deste gás.

Alguns estudos encontraram frequências elevadas de micronúcleos em eritrócitos de peixes (*Oreochromis niloticus*) que habitam locais poluídos (MATSUMOTO *et al.*, 2006), e na avaliação de efluentes industriais (ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2003) ou que são expostos a diferentes químicos.

Em relação aos eritrograma e plaquetometria, os menores valores obtidos são de animais do FN-PE em comparação aos dados da amostra de VIT-ES, apesar disso, estão de acordo com o intervalo de referência proposto por SANTOS *et al.* (2009) para a espécie no mesmo local de captura. Nos resultados obtidos no leucograma, os animais do grupo G1 (FN-PE) apresentam diferenças significativas com os de VIT-ES, no entanto, apesar das diferenças encontradas nos animais de FN-PE, os valores do eritrograma, plaquetometria, leucócitos totais, heterófilos, monócitos e eosinófilos, também estão de acordo com o intervalo de referência proposto por SANTOS *et al.* (2009) e ANDERSON *et al.* (2012) para a espécie. Ainda no G1, os animais apresentaram menores valores de linfócitos ($582 \pm 363/\mu\text{L}$), em relação ao G2 ($1075 \pm 465/\mu\text{L}$), estando compatível com o efeito produzido pelo estresse pelo método de captura nessa área, que envolveu perseguição contínua.

6.5. Teste de micronúcleo e hemograma em função da presença de fibropapilomas

Nossos dados revelam ocorrência de fibropapiloma em 37,3% dos indivíduos coletados na área VIT-ES. Esses dados são inferiores aos 44,1% encontrados por SANTOS *et al.* (2005), para coletas realizadas no período de junho de 2001 a julho de 2004, na mesma localidade. Entretanto, nossos dados são superiores daqueles observados por BAPTISTOTTE (2007) que avaliou outras áreas do litoral brasileiro entre Santa Catarina e o Ceará, com índice de 15,4% dos indivíduos. Não há registro na literatura de presença de fibropapiloma em exemplares de FN-PE.

Quando comparados os dois grupos da área VIT-ES, a maior ocorrência de micronúcleos em eritrócitos ocorreu em animais portadores da fibropapilomatose (grupo G3: $164.000 \pm 63.000/\mu\text{L}$), estando de acordo com o descrito por FENECH *et al.* (2002) que afirma que há relação entre a taxa de micronúcleos e o desenvolvimento de neoplasias, sendo apoiada por observações, tais como, maior frequência de eritrócitos micronucleados em indivíduos que apresentam predisposição ao câncer.

O câncer é uma doença genética de etiologia multifatorial, que estão principalmente

relacionadas a uma classe especial de genes chamados de genes do câncer ou proto-oncogenes. Os oncogenes normalmente desempenham funções celulares básicas, em geral relacionadas à regulação da multiplicação celular. Entretanto, vários tipos de eventos podem transformar um proto-oncogene em oncogene, estado no qual ele promove as duas principais características do câncer: multiplicação celular descontrolada, levando a um crescimento excessivo de um grupo celular e desenvolvimento do tumor primário e a dispersão de células tumorais pelo corpo, um processo denominado metástase. Uma das principais formas pelas quais os proto-oncogenes podem ser transformados em seu estado causador de câncer (oncogênico) é pela mutação que ocorre em um proto-oncogene de uma única célula, que então sofre várias multiplicações celulares para formar um tumor. Como todas as células do tumor possuem o oncogene, pode-se concluir que um tumor é um clone mutante. Por isto, o câncer é tido como uma doença predominantemente genética (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

Assim, a formação de micronúcleos na divisão celular, resultante da quebra de cromossomos devido ao não-reparo ou ao reparo incorreto de lesões do DNA ou à incorreta segregação por causa de mal funcionamento do ciclo mitótico, são eventos que podem ser induzidos por um estresse oxidativo, exposição aos clastógenos, defeitos genéticos no ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA, como também deficiências em nutrientes exigidos como cofatores no metabolismo do DNA e no maquinário de segregação cromossômica (FENECH, 2005; BONASSI *et al.*, 2007). Todos esses eventos podem causar a formação de micronúcleos por rearranjos cromossômicos, expressões gênicas alteradas ou aneuploidia, os quais são efeitos associados com fenótipo de instabilidade cromossômica frequentemente presente no câncer (FENECH, 2002).

Em estudos com humanos, alguns autores buscaram relacionar a ocorrência de micronúcleos com o risco para desenvolvimento ou recorrência de carcinomas de boca. RAMIREZ e SALDANHAV (2002) observaram aumento da frequência de micronúcleos nas células bucais esfoliadas da mucosa adjacente à carcinomas de pacientes alcoolistas quando comparados aos da mucosa clinicamente normal do sítio contralateral ou aos da mucosa gengivo-labial. BLOCHING (2000) e CASARTELLI (2000) tiveram achados similares em raspados de carcinomas quando comparados a lesões pré-malignas e nessas quando comparadas à mucosa normal. Não foram encontrados na literatura dados referentes à frequência de eritrócitos micronucleados em animais de ambientes aquáticos ou terrestres, e relacionando com o potencial carcinogênico.

FENECH *et al.* (2005) apontam que a utilização da técnica dos micronúcleo em células de diferentes tecidos é um campo promissor, mas chamam a atenção para necessidade da padronização dos protocolos, da comparação dos resultados de diferentes laboratórios e do estudo desse fenômeno nos diferentes tecidos, a fim de que sejam encontradas as fontes da variabilidade dos resultados.

Dentro deste contexto, CHEQUER (2008) afirma que é clara a importância do estudo do potencial mutagênico dos diversos compostos aos quais os organismos podem se expor, entretanto, destaca que um evento mutagênico não necessariamente leva ao desenvolvimento do câncer, porém, a detecção da atividade mutagênica é um importante indício para a avaliação do risco à doença.

Os programas de conservação de tartarugas marinhas têm se voltado cada vez mais para o monitoramento da saúde das populações, devido ao risco imposto pela fibropapilomatose cutânea, enfermidade mais importante como ameaça à conservação das tartarugas marinhas (AGUIRRE e LUTZ, 2004). Neste contexto, a determinação de valores hematimétricos tem sido utilizada como ferramenta de avaliação da saúde dos animais (JACOBSON, 1998; AGUIRRE e BALAZS, 2000). Estudos hematológicos comparativos de animais doentes e sadios podem gerar informações importantes para o manejo e conservação das espécies (AGUIRRE e LUTZ, 2004).

Em relação ao eritrograma, plaquetometria e monócitos, os menores valores obtidos são de animais do G3 (portadores de fibropapilomas) quando comparados aos valores de G2 (não portadores de tumores), porém, não apresentando diferença significativa quando comparados. Apesar disso, todos os valores obtidos para essas análises, em todos os grupos, se encontram de acordo com o intervalo de referência proposto por ANDERSON *et al.* (2011) para a espécie.

Nos resultados obtidos no leucograma (Tabela 3), os animais do grupo G3 apresentaram os menores valores de leucócitos totais, heterófilos, linfócitos, eosinófilos e basófilos quando comparados ao G2, demonstrando um comprometimento imunológico. NORTON *et al.* (1990) e CRAY *et al.* (2001) realizaram estudos com tartarugas verdes acometidas pela fibropapilomatose e evidenciaram que esses animais apresentavam leucocitose, heterofilia e linfopenia. Resultados similares foram obtidos por WORK e BALAZS (1999), que observaram uma diminuição progressiva de linfócitos e um aumento progressivo de heterófilos conforme o aumento da gravidade da doença. Nesses estudos,

monócitos, eosinófilos e basófilos apresentaram poucas variações. Além disso, a heterofilia e a linfopenia foram atribuídas ao estresse e imunossupressão causados pela doença.

BRENES CHAVES *et al.* (2013) realizaram estudos de hematologia e bioquímica plasmática do sangue comparando tartarugas saudáveis e tartarugas com tumores, e encontraram diferenças significativas apenas em quatro parâmetros, CHCM, heterófilos, linfócitos e monócitos. No caso do CHCM, o valor médio obtido por esses autores foi significativamente menor em tartarugas com tumores em comparação com tartarugas saudáveis talvez devido a uma deficiência de ferro (hipocromia) ou uma resposta inapropriada do organismo a uma doença crônica como a causada pela presença de fibropapilomas (AGUIRRE *et al.*, 1995; WORK e BALAZS, 1999). Em nosso estudo, não foram observadas alterações nas concentrações de hemoglobina e CHCM que justifiquem a deficiência descrita acima pelos autores.

BRENES CHAVES *et al.* (2013) encontraram valores de heterófilos significativamente menores em tartarugas com tumores do que em tartarugas saudáveis. Essa mesma alteração foi encontrada em nosso trabalho, porém, nossos dados diferem de outros estudos sobre tartarugas verdes, no qual um aumento nos valores de heterófilos foi realmente encontrado em animais com tumores (AGUIRRE *et al.*, 1995; WORK e BALAZS, 1999). Segundo Meneses *et al.* (1993), uma diminuição nos valores (heteropenia) poderia ser causada por processos inflamatórios crônicos, devido a uma má resposta do sistema imunológico.

No presente estudo, os animais com fibropapiloma apresentaram diminuição dos valores de linfócitos (linfopenia), concordando com o estudo realizado por BRENES CHAVES *et al.* (2013) em tartarugas da espécie *Lepidochelys olivacea* com e sem tumores. A mesma alteração foi encontrada em outros estudos sobre as tartarugas verdes com fibropapilloma (AGUIRRE *et al.*, 1995; ANDERSON *et al.*, 2012) e pode estar associada a uma supressão do sistema imunológico associado com as fases iniciais de infecções virais (MENESES *et al.*, 1993; ANDERSON *et al.*, 2012; BRENES CHAVES *et al.*, 2013).

De acordo com o WORK e BALAZS (1999) tartarugas verdes com fibropapiloma podem apresentar valores aumentados de monócitos (monocitose) como uma resposta a cronicidade do processo infeccioso ou qualquer outra estimulação imunogênica. No entanto, de acordo com AGUIRRE *et al.* (1995) e BRENES CHAVES *et al.* (2013) a diminuição ou ausência de monócitos pode ser um achado normal em tartarugas com tumores. Os valores de monócitos encontrados em nosso estudo não diferiram significativamente entre animais com e sem tumores.

As análises bioquímicas e hormonais em animais com e sem fibropapilomatose de Vitória/ES evidenciaram que as alterações dos níveis de cortisol e lactato dos indivíduos com fibropapilomatose são comparáveis àquelas alterações decorrentes de estresse intenso devido ao processo de captura, sugerindo que as alterações da fibropapilomatose devem representar um estresse alto e prolongado nesses indivíduos, com sinais de alto gasto energético. Quando comparamos os dados de linfócitos da amostra de Vitória/ES sem papilomatose (G2) com a amostra de ferenha do Noronha/PA (G2) que foram submetidos a um processo de estresse de captura alto e rápido, observamos que os valores médios do grupo G1 também são reduzidos, não diferindo significativamente dos valores observados no grupo de Vitória/ES com papilomatose (G3), concordando com os achados de WORK e BALAZS (1999) de que o estresse contribui para a linfopenia.

Ainda, podemos sugerir, pelos nossos achados, que as alterações bioquímicas dos níveis do cortisol provocadas por um estresse rápido (captura) ou prolongado (presença de doença), são equivalentes entre si. O cortisol, em condição de estresse, induz a diminuição dos linfócitos circulantes (linfopenia), ocorrendo principalmente por linfólise das células T sensíveis aos corticosteróides e por marginação ou sequestro dos linfócitos em locais extravasculares (JAIN, 1993; FLINT *et al.*, 2010; THRALL *et al.*, 2012), fato esse que explica a ausência de diferença significativa para os valores de linfócitos entre os grupos G1 e G3.

Em relação ao estresse, o cortisol pode estimular uma elevação moderada do número de heterófilos circulantes (heterofilia), variando conforme a espécie. A heterofilia é causada principalmente pelo aumento na liberação de heterófilos da medula óssea, mas também ocorre devido à menor migração dos heterófilos da circulação para os tecidos, assim como à diminuição da aderência dos heterófilos, com consequente desvio do *pool* marginal para o *pool* circulante (FARVER, 2008; FERRANDO, 2010; THRALL *et al.*, 2012). Esse fato foi observado no grupo G1 (animais saudáveis), mas não foi observado no G3 (animais com fibropapilomatose), indicando que apesar de se manifestar pela presença de tumores cutâneos benignos, a doença pode apresentar formas verrucosas, de tamanho variável e muitas vezes ulcerado (MASCARENHAS e IVERSON, 2008). Os tumores ulcerados podem causar infecções bacterianas secundárias e a consequente bacteremia (AGUIRRE e LUTZ, 2004), que inicialmente causa leucocitose com aumento de heterófilos e em quadros mais crônicos causa um consumo excessivo dessas células levando à diminuição do número circulante, fenômeno esse compatível com o observado nos animais com fibropapilomas (G3) no

presente estudo.

6.6. PCR das amostras de sangue e tecido tumoral

O padrão de propagação de fibropapilomatose é a de uma doença infecciosa (HERBST *et al.*, 1995). Um herpesvírus foi identificado em 100% de tumores induzidos por inoculação de infiltrados de células de tumor (ENE *et al.*, 2005) e 95% de infecções naturais (QUACKENBUSH *et al.*, 2001). No entanto, a doença parece ter um carácter multifatorial, uma vez que a presença de ectoparasitas (GREENBLATT *et al.*, 2004), a poluição ambiental (TOREZANI *et al.*, 2009 e SANTOS *et al.*, 2010), ingestão de macroalgas (VAN HOUTAN *et al.*, 2010) bem como a temperatura da água (HAINES e KLEESE, 1977) parecem influenciar a ocorrência da doença.

Os herpesvírus são associados com várias enfermidades de tartarugas marinhas incluindo a doença dos pulmões-olhos-traquéias (*Lung-eye-trachea disease*), a "doença da mancha cinza" (*Gray patch disease*) e a fibropapilomatose (CURRY *et al.*, 2000; STACY *et al.*, 2008). Das seis variantes de herpesvírus que acometem as tartarugas, o Chelonid herpesvirus 5 é o vírus associado a fibropapilomatose (DAVIDSON *et al.*, 2009).

A hipótese de que o herpesvírus seja o agente etiológico da doença também tem sido constatada pelos resultados obtidos em inquéritos sorológicos de animais doentes (COBERLEY *et al.*, 2002). HERBST *et al.* (1998) desenvolveram um ensaio imunoenzimático para detectar anticorpos 7S específicos contra a glicoproteína H do Chelonid herpesvirus 5, após a expressão em um baculovírus. A monitoria sorológica de animais negativos e experimentalmente infectados apresentou 100% de especificidade, embora o tempo necessário para a soroconversão de muitos animais tenha sido extenso. Apesar da baixa sensibilidade deste teste, os dados de monitoramento sorológico com tartarugas procedentes da Flórida (USA) indicaram uma prevalência de 80%. Inquéritos epidemiológicos apontam diferenças genéticas entre as cepas de herpesvírus isoladas em diversas áreas geográficas (GREENBLATT *et al.*, 2005; ENE *et al.*, 2005).

Embora todas as amostras de tecido tumoral dos animais do grupo G4 tenham resultado como positivo para a presença do DNA do *Chelonid herpesvirus 5*, somente 10% dessas amostras mostraram-se positivo a partir do DNA do sangue total, indicando que o DNA viral está restrito a locais onde há o desenvolvimento tumoral. Estudos prévios já haviam

detectado traços do DNA de herpesvírus em fibropapilomas de tartarugas verdes, tartarugas cabeçudas e tartarugas oliva no Havaí, Flórida e Costa Rica (QUACKENBUSH et al., 2001). Por outro lado, a expressão do gene do DNA polimerase não foi detectada em fibropapilomas, sugerindo que a infecção é predominantemente latente nos tumores, semelhante ao que ocorre com o herpesvírus humano 8 nas lesões de sarcoma de Kaposi ou do gallid herpesvírus 2 causador da doença de Marek das galinhas (GREENBLATT et al., 2004).

PAGE-KARJAN et al. (2012) avaliaram a ocorrência de *Chelonid fibropapilloma associated herpesvirus* em tumores de tartarugas marinhas. Dos 34 tumores, apenas um não obteve resultado positivo na PCR para o vírus, resultando em 97,2 % de positividade dos tumores analisados. Nossos resultados são comparáveis ao autor e a outros estudos que descreveram o uso da técnica de PCR para detectar o DNA do herpesvírus em tecidos tumorais. O DNA do *Chelonid fibropapilloma associated herpesvirus* foi detectado em 100% e 95,7 % dos tumores analisados a partir de tartarugas verdes no Hawaii e na Flórida, respectivamente (LACKOVICH et al., 1999; LU et al., 2000).

PAGE-KARJAN et al. (2012) realizaram um estudo para detectar a presença do DNA do *Chelonid fibropapilloma associated herpesvirus* em tecido obtido por biópsia de pele de tartarugas com e sem tumores. Os autores descobriram que várias amostras de pele saudável obtidas de tartarugas com tumor foram positivas na PCR. Das 21 biópsias de pele saudável em animais que tiveram tumores em outros locais, 47,6% foram positivas. O resultado desses autores concordam com os relatos de LU et al. (2000) e QUACKENBUSH et al. (1998) que documentam a presença de DNA do herpesvirus na pele saudável de tartarugas verdes com tumores no Havaí, sendo que 57,1% e 93,3% das amostras de pele foram positivas, respectivamente. Na Austrália, amostras de pele saudável de tartarugas verdes com tumores apresentaram 45,5% de positividade na PCR quantitativa (QUACKENBUSH et al., 2001).

O DNA do *Chelonid herpesvirus* já foi detectado em alguns tecidos, tais como os tumores cutâneos (fibropapilomas), tumores nos pulmões, superfícies serosas e mucosas no esôfago, laringe e traqueia (fibromas), tecido cicatricial onde um tumor (fibropapiloma) foi previamente removido, e tecidos não tumorais de pele, pulmões, rins, coração, baço, fígado, cérebro, tecido periorbital, conjuntiva, ovário, testículo, da língua, da vesícula biliar, intestino e bexiga (HERBST et al., 1999; LACKOVICH et al., 1999; QUACKENBUSH et al., 2001; HERBST et al., 2004; KANG et al., 2008; PAGE-KARJAN et al., 2012).

O DNA do *Chelonid fibropapilloma associated herpesvirus* também já foi detectado em biópsia de pele de tartarugas sem qualquer tumor aparente. Em estudo realizado por PAGE-KARJAN *et al.* (2012), 105 tartarugas saudáveis foram capturados e biopsiadas, e 32,4% foram positivos para o vírus na PCR. Estes resultados são semelhantes aos relatados em outras partes do mundo. Em outro estudo, amostras de pele de 14 tartarugas verdes saudáveis na Austrália, obtiveram 21,4% de positividade para o vírus por PCR quantitativo (QUACKENBUSH *et al.*, 2001). Contudo, esses resultados também são contraditórios com alguns outros relatos publicados. Em um estudo sobre tartarugas verdes sem tumores encalhadas na Flórida, todas as amostras de pele foram negativas na PCR (LACKOVICH *et al.*, 1999). Em outros dois estudos realizados em tartarugas verdes no Hawai, todas as amostras de pele de tartarugas verdes normais foram negativas na PCR (LU *et al.*, 2000; QUACKENBUSH *et al.*, 1998).

A circulação do vírus na corrente sanguínea de tartarugas foi confirmada por MONEZI *et al.* (2006), ao analisarem 16 amostras de sangue e tumor de tartarugas na base de Ubatuba do Projeto TAMAR-ICMBio. Nesse estudo, foi realizado a PCR a partir de sangue extraído do seio venoso cervical e de tumores extraídos cirurgicamente e detectado o herpesvírus em pelo menos um tipo de amostra em 11 animais, sendo que 8 amostras de tumores e 4 de sangue foram positivas. Entretanto, não foi utilizado um primer específico na PCR para o *Chelonid fibropapilloma associated herpesvirus*, descrito por QUACKENBUSH *et al.*, (2001) e confirmado na PCR de tumores por RODENBUSCH (2012). Além disso, nunca foi realizado um estudo maior para correlacionar o vírus encontrado nos tumores e no sangue.

A consistente associação deste vírus com tumores, seja através de reação em cadeia da polimerase (PCR) ou demonstrado através de hibridização *in situ*, bem como o desenvolvimento da doença utilizando extratos de células de tumores em animais de cativeiro, resultaram em um vínculo associativo causal comumente percebido (QUACKENBUSH *et al.*, 2001; HERBST *et al.*, 2004; KANG *et al.*, 2008; PAGE-KARJAN *et al.*, 2012). No entanto, o vírus tem mostrado estar presente, sorologicamente ou através de técnicas de biologia molecular, em alguns animais normais. Isso levanta a possibilidade de que existem fatores adicionais, sejam eles ecológicos, imunológicos ou microbianos, envolvidos no desenvolvimento da doença (PAGE-KARJAN *et al.*, 2012).

Através de sequenciamento de segmentos do genoma viral de diferentes tartarugas de vida-livre foi determinada a existência de 5,6% de diversidade em sequências de nucleotídeos e em função de taxas de mutações previstas, conclui-se que pelo menos quatro linhagens

conduzem a uma variante do Chelonid herpesvirus 5 que divergiu milhões de anos atrás (RODENBUSCH, 2012). Portanto, o aparecimento de surtos de fibropapilomatose é pouco provável que seja devido a mutações do vírus, pois é improvável que essas mutações tenham ocorrido nas quatro linhagens (GREENBLASTT *et al.*, 2005). Segundo ENE *et al.* (2005), é mais provável que as mudanças no ambiente ou fatores ecológicos que afetam a transmissão do vírus ou da expressão da doença expliquem o recente aumento da prevalência da doença.

Sabendo-se que a excisão de um fragmento do tumor ou a biópsia cutânea de um tecido saudável são considerados métodos invasivos e relativamente dolorosos, necessitando inclusive de anestesia prévia, essa etapa do nosso estudo objetivou a detecção do Chelonid fibropapilloma associated herpesvirus no sangue circulante de tartarugas verdes com e sem tumores da fibropapilomatose, para obter um método menos invasivo de detecção do vírus e consequentemente viabilizar com mais segurança os estudos de ocorrência do agente viral, sem riscos de disseminação. No entanto, a técnica de PCR foi bem sucedido em amplificar o vírus de tumores, porém não se obteve o mesmo êxito com as amostras de sangue, tanto em animais com fibropapilomatose quanto em animais sem a doença.

As diferenças nestes vários estudos não são facilmente explicados. Segundo PAGE-KARJAN *et al.* (2012), algumas variações naturais podem ser esperado com base nas mais diferentes regiões geográficas, genética populacional e condições ambientais em em geral.

Por fim, a avaliação de biomarcadores em tartarugas marinhas podem representar um importante passo na conservação das espécies, uma vez que os mesmos podem antecipar alterações em grupos de animais em determinadas regiões, auxiliando programas de biomonitoramento. O uso de um conjunto de biomarcadores tem se mostrado mais eficaz que a avaliação de apenas um indicador (FREIRE *et al.*, 2008).

Os mesmos autores ainda relatam, que para um bom resultado de monitoramento é importante que sejam pré-determinados quais biomarcadores serão utilizados e também qual espécie será utilizada, levando em consideração as particularidades da área em estudo além das características inerentes de cada biomarcador e da espécie sentinela. Ainda, o uso de biomarcadores em avaliações de ambientes aquáticos é fortemente recomendado para que se possa produzir dados confiáveis que possibilitarão a implementação de medidas adequadas para a proteção e/ou recuperação dos ecossistemas aquáticos.

7. CONCLUSÃO

Determinar o estado fisiológico através de exames laboratoriais de uma espécie ameaçada de extinção como a da tartaruga verde (*Chelonia mydas*) é importante para elaborar planos de conservação apropriados, principalmente no que diz respeito à atenção à saúde dos animais. No mundo, são poucos os relatos publicados de parâmetros laboratoriais para avaliação do metabolismo ou condição geral de saúde para tartarugas marinhas.

Podemos concluir que, em tartarugas marinhas, os valores elevados de cortisol e lactato observados são compatíveis com o fenômeno induzido pelo estresse, seja durante a captura dos animais (estresse intenso e agudo) ou ocasionado pela presença do fibropapiloma (estresse crônico e prolongado). Os níveis de cortisol e de lactato podem ser utilizados como biomarcador de estresse e devem ser sempre avaliados em conjunto. As alterações bioquímicas dos níveis do cortisol e lactato, provocadas por um estresse rápido (captura) ou prolongado (presença de doença), são equivalentes entre si. Os níveis de cortisol e de lactato são bons marcadores de resposta ao estresse e se mostram significativamente diferentes. A glicose não é um bom marcador para se avaliar resposta ao estresse rápido ou prolongado. A falta de informações sobre níveis basais de cortisol e lactato em animais não estressados é um problema comum em estudos de estresse em tartarugas marinhas, particularmente quando se comparam respostas de estresse com diferentes componentes. Para tanto, utilizar a referência de valores para grupos com baixo ou nenhum estresse pode ser a solução para se avaliar as respostas bioquímicas ao estresse, já que mesmo em baixos níveis de estresse esses dois marcadores já mostram alterações significativas. Os valores de cortisol aumentaram significativamente em média 5 vezes mais nos indivíduos submetidos a estresse agudo e rápido e 4 vezes nos indivíduos submetidos a estresse crônico e prolongado (acima de 20 ng/ml), enquanto que o lactato aumentou em 50% nos indivíduos submetidos a estresse agudo e rápido e 33% vezes nos indivíduos submetidos a estresse crônico e prolongado.

Os programas de conservação de tartarugas marinhas têm se voltado cada vez mais para o monitoramento da saúde das populações, devido ao risco imposto pela fibropapilomatose cutânea, enfermidade mais importante como ameaça à conservação destes animais. Neste contexto, a determinação de valores hematológicos e testes de genotoxicidade têm sido utilizados como ferramentas de avaliação da saúde, comparando animais doentes e sadios e gerando informações importantes para o manejo e conservação das espécies. Os testes de genotoxicidade incluem diversas metodologias, e representam uma importante parte

da pesquisa para avaliação da toxicidade celular e identificar o potencial carcinogênico, e consequentemente proteger o material genético do indivíduo. Alguns autores enfatizam a necessidade de testes rápidos e confiáveis que detectem essa genotoxicidade e, dessa forma, o teste do micronúcleo encontrou seu lugar em biomonitoramento, como um teste que oferece um procedimento técnico fácil, rápido e de baixo custo. Nesse contexto, podemos concluir ainda, que animais de ambientes altamente alterados, assim como com a presença de fibropapilomatose apresentaram maior ocorrência de micronúcleos eritrocitários, podendo o teste de micronúcleo eritrocitário ser sugerido como um bom marcador de alteração ambiental e carcinogênica. Ainda nesse contexto, a avaliação hematimétrica de tartarugas-verde pode auxiliar na interpretação do estado fisiológico dos animais e deve ser realizado em conjunto com teste de micronúcleo eritrocitário, sendo importante, verificar as alterações hematimétricas decorrente do estresse ou infecções bacterianas secundárias.

A partir do resultado alcançado nas análises moleculares, podemos sugerir que uma análise quantitativa do DNA viral no sangue circulante, via PCR em tempo real, pode ser o próximo passo para estabelecer se a viremia é realmente constante nos animais acometidos pela fibropapilomatose.

8. REFERÊNCIAS

AGUIRRE, A. A.; BALAZS, G. H. Blood biochemistry values of green turtles, *Chelonia mydas*, with and without fibropapillomatosis. *Comparative Hematology International*, v.10, n. 1, p. 132-137, 2000.

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

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

ALKINDI, A.; KADIM, I.T.; MAHMOUD, I.Y.; MAHGOUB, O.; PLUDE, J.; AL-MAANI, M. AND BAKHEIT, C.S. Physiological response of two age groups of Omani male goats to short road transportation in relation to circulating levels of gonadotropins, cortisol, thyroid hormones, sex steroids and plasma chemistry. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **4**, 737–741, 2008.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in Water. *Mutation Research*, v.343, p. 121-135, 1995.

ANANTHASWAMY, H.N.; WILLIAM E.P. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochemistry and photobiology* 52:6, 1119-1136, 1990.

ANDERSON E.T., MINTER L.J., CLARKE E.O., MROCH R.M., BEASLEY J.F., HARMS C.A. The effects of feeding on hematological and plasma biochemical profiles in green (*Chelonia mydas*) and Kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*) sea turtles. *Veterinary Medicine International* 2011:1–7, 2012.

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

ANDREANI, G.; SANTORO, M.; COTTIGNOLI, S.; FABBRI, M.; CARPENÈ, E.; ISANI, G. Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *Science of The Total Environment*, v.390, p.287-294, 2008.

BALAZS, G.H.; POOLEY, S.G. *Research plan for marine turtle fibropapilloma*. Honolulu: U.S. Department of Commerce, NOAA Technical memorandum, 113p., 1991.

BAPTISTOTE, C. *Caracterização especial e temporal da fibropapilomatose em tartarugas marinhas da costa brasileira*, Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2007.

BARSIENE, J.; LEHTONEN, K.K.; KOEHLER, A.; BROEG, K.; VUORINEN, P.J.; LANG, T.; PEMPKOWIAK, J.; SYVOKIENE, J.; DEDONYTE, V.; RYBAKOVAS, A.; REPECKA, R.; VUONTISJARVI, H. & KOPECKA J. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipeda-Būtinge area (Baltic Sea). *Marine Pollution Bulletin*, v.53, p.422-436, 2006.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.* 1:3–26, 1991.

BELLINI, C.; SANCHES, T.M. Reproduction and feeding of marine turtles in the Fernando de Noronha Archipelago, Brasil. *Marine Turtle Newsletter*, v.74, p.12-13, 1996.

BLOCHING, M. Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa to Predict the Relative Risk of Cancer in the Upper Aerodigestive Tract Using the MN-assay. *Oral Oncology*, Oxford, v. 36, n. 6, p. 550-555, 2000.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D.M. & SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*, v.78, Suppl 1, p.93-98, 2006.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M.P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCICI, A.;

HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis Advance Access*, v. 28, p.625-631, 2007.

BOSTROM, B. L.; JONES, D. R. Exercise warms adult leatherback turtles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 147.2: 323-331, 2007.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment*, v.247, n.2-3, p.295-311, 2000.

CARPENÈ E, SERRA R, ISANI G. Effects of heavy metals on algae. In: Cheremisinoff PN, editor. *Encyclopedia of environmental control technology*. Houston, Texas: Gulf Publishing Company, p. 707–59, 1995.

CASARTELLI, G. Micronucleus Frequencies in Exfoliated Buccal Cells in Normal Mucosa, Precancerous Lesions and Squamous Cell Carcinoma. *Analytical & Quantitative Cytology & Histology*, St. Louis, v. 22, n. 6, p. 486-492, 2000.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents, *Aquatic Toxicology*, v.74, p.264-271, 2005.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research*, v.538, p.81-91, 2003.

CHANG, W.P.; HWANG, B.F.; WANG, D.; WANG, J.D. Cytogenetic effect of chronic low-dose, low-dose-rate γ -radiation in residents of irradiated buildings. *The Lancet*, v.350, p. 330-333, 1997.

CHEN, C. Cytogenetic Damage in Buccal Epithelia and Peripheral Lymphocytes of Young Healthy Individuals Exposed to Ozone. *Mutagenesis*, Oxford, v. 21, n. 2, p. 131-137, 2006.

CHEQUER, F.M.D. *Utilização do teste de micronúcleo na avaliação da toxicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13*. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2008.

COBERLEY, S. S.; CONDIT, R. C., HERBST, L. H.; KLEIN, P. A. Identification and expression of immunogenic proteins of a disease-associated marine turtle herpesvirus. *J. Virol.*, 76, 10553-10558, 2002.

CONTARTEZE, R. V. L., MANCHADO, F. B., GOBATTO, C. A., & MELLO, M. A. R.

Biomarcadores de estresse em ratos exercitados por natação em intensidades igual e superior à máxima fase estável de lactato. *Rev Bras Med Esporte*, 13(3), 169-74, 2007.

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

CUBAS, P.H.; BAPTISTOTTE, C. *Chelonia* (tarataruga, cágado, jabuti). In: Z.S. CUBAS; J.C.R. SILVA; J.L. CATÃO-DIAS (eds.), *Tratado de animais selvagens*. São Paulo, Roca, p. 108-110, 2007.

CURRY, S.S.; BROWN, D.R.; GASKIN, J.M.; JACOBSON, E.R.; EHRHART, L.M.; BLAHAK, S.; HERBEST, L.H.; KLEIN, P.A. Persistent infectivity of a disease-associated herpesvirus in green turtles after exposure to seawater. *Journal of Wildlife Diseases*, 36:792-797, 2000.

DAVISON A.J.; EBERLE R.; EHLERS B.; HAYWARD G.S.; MCGEOCH D.J. The order Herpesvirales. *Arch Virol* 154: 171–177, 2009.

DAY, R.D.; SEGARS, A.L.; ARENDT, M.D.; LEE, A.M.; PEDEN-ADAMS, M.M. Relationship of Blood Mercury Levels to Health Parameters in the Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*). *Environmental Health Perspectives*. v.115, n. 10, 2007.

DE MOFFARTS, B.; PORTIER, K.; KIRSCHVINK, N.; COUDERT, J.; FELLMAN, N.; VAN ERCK, E.; LETELLIER, C.; MOTTA, C.; PINCEMAIL, J.; ART, T.; LEKEUX, P. Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n – 3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. *The Vet. Journal*, n. 174, p. 113-121, 2007.

DELESALLE, C.; DEWULF, J.; LEFEBVRE, R.A.; SCHUURKES, J.A.J.; PROOT, J.; LEFERE, L.; DEPREZ, P. Determination of Lactate Concentrations in Blood Plasma and Peritoneal Fluid in Horses with Colic by an Accusport Analyzer. *J. Vet. Intern. Med.*, n. 21, p. 293–301, 2007.

ELSASSER, T.H.; KLASSING, K.C.; FILIPOV, N.; THMPSON, F. The metabolic consequences of stress: targets for stress and priorities use. In: Moberg, G.P.; Mench, J.A. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI Publishing, 2000.

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

ERGENSE, S.; ÇAVAS, T.; ÇELİK, A.; KOLELİ, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotóxico damage in relation to water pollution, *Ecotoxicology*, v.16, p.385-391, 2007.

FACEMIRE, C.; AUGSPURGER, T.; BATEMAN, D.; BRIM, M.; CONZELNANN, P.; DELCHAMPS, S. Impacts of mercury contamination in the southeastern United-States. *Water Air Soil Pollut*, v.80, n.4, p.923–926, 1995.

FARVER, T.B. Concepts of normality in clinical biochemistry. p. 1–25, in Kaneko J., Harvey J., Bruss M. (Eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Sixth Edition. Academic Press. New York. 2008.

FENECH, M. Chromosomal Biomarkers of Genomic Instability Relevant to Cancer. . *Drug Discovery Today*, v.22, p. 1128-1137, 2002.

FENECH, M. *In vitro* micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods in Molecular Medicine*, v.111, p. 3-32, 2005.

FENECH, M.; BAGHURST,P.; LUDERE, W.; TURNER, J.; RECORD, S.; CEPPI, M.; BONASSI, S. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, β - carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability - results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis*, v. 26, p. 991-999, 2005.

FERRANDO, V. *Bioquímica sanguínea de la tortuga verde juvenil (Chelonia mydas) en Cerro Verde, Rocha, Uruguay. Tesis de Grado presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias*. Universidad de la República, Uruguay, 2010.

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

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste do Micronúcleo: Uma Triagem para Avaliação Genotóxica. *Saúde e Pesquisa* 1.3 : 337-340, 2009.

FORMIA, A.; DEEM, S.; BILLES, A.; NGOUESSONO, S.; PARNELL, R.; COLLINS, T.; SOUNQUEST, G.P.; GIBUDI, A.; VILLARUBIA, A.; BALAZS, G.H.; SPRAKER, T.R. Fibropapillomatosis confirms in *Chelonia mydas* in the Gulf of Guinea, West Africa. *Marine Turtle Newsletter*, 116: 20-22, 2007.

FREIRE, M.M.; SANTOS, V.G.; GINUINO, I.S.F.; LINDE, A.R. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, v.12, n3, p.347-354, 2008.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genome damage in population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. *Journal of Applied Toxicology*, v.22, p. 255, 2002.

GARDNER, S.C.; FITZGERALD, S.L.; VARGAS, B.A.; RODRÍGUEZ, L.M. Heavy metal

accumulation in four species of sea turtles from the Baja California peninsula, Mexico. *BioMetals*, v.19, p.91–9, 2006.

GATTAS, G.J. Frequency of Oral Mucosa Micronuclei in Gas Station Operators after Introducing Methanol. *Occupational Medicine*, Philadelphia, v. 51, n. 2, p. 107-113, 2001.

GAUTHIER, J. M.; DUBEAU, H.; RASSART, E.; JARMAN, W. M.; WELLS, R. S. Biomarkers of DNA damage in marine mammals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 444(2), 427-439, 1999.

GEORGE, R.H. Health problems and diseases of sea turtles. In Lutz P.L. and Musick J.A. (eds) *The biology of sea turtles*, volume I. Boca Raton, USA: CRC Press, pp 363- 385, 1997.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. Introdução à bioquímica veterinária. 2ª edição, Porto Alegre:Editora da UFRGS, 2006.

GREENBLATT, R.; QUACKENBUSH, S.; CASEY, R.; ROVNAK, J.; BALASZ, G.; WORK, T.; CASEY, J.; SUTHON, C. Genomic variation of the fibropapilloma- associated marine turtle herpesvirus across seven geographic areas and three host species. *J. Virol.*, 79(2), 1125-1132, 2005.

GREGORY, L. F.; GROSS, T. S.; BOLTEN, A. B.; BJORNDAL, K. A.; GUILLETTE JR, L. J. Plasma Corticosterone Concentrations Associated with Acute Captivity Stress in Wild Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*). *General and Comparative Endocrinology* 104.3: 312-320, 1996.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER J.H; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. Mutação Cromossômica I: Alterações na Estrutura Cromossômica in: *Introdução à Genética*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.197-232, 1998.

GROSSMAN, A.; MENDONÇA, P.; COSTA, M. R.; BELLINI, C. Morphometrics of the green turtle at the Atol das Rocas Marine Biological Reserve, Brazil. *Marine Turtle Newsletter*, 118, 12-13, 2007.

GUERLET, E.; LEDY, K.; MEYER, A.; GIAMBERINI, L. Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussels: a 2-year integrative field study of seasonal and pollution-induced variations. *Aquatic Toxicology*, v.81, n.4, p.377-388, 2007.

GUILHERME, S.; VÁLEGA, M.; PEREIRA, M.E.; SANTOS, M.A.; PACHECO, M. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient, *Ecotoxicology Environmental Safety*, v.70, p.411-421, 2008.

GUIMARÃES, S.M.; GITIRANA, H.M.; WANDERLEY, A.V; MONTEIRO-NETO, C.; LOBO-HAJDU, G. Evidence of regression of fibropapillomas in juvenile green turtles *Chelonia mydas* caught in Niterói, southeast Brazil. *Disease of Aquatic Organisms*. 102:243-247, 2013

HAINES H.; KLEESE W. Effect of water temperatura on a herpesvirus infection of sea turtles. *Infection and Immunity*. 15 (3): 756-759, 1977.

HAMANN, M., LIMPUS, C., HUGHES, G., MORTIMER, J., & PILCHER, N. Assessment of the conservation status of the leatherback turtle in the Indian Ocean and South East Asia, including consideration of the impacts of the December 2004 tsunami on turtles and turtle habitats. *IOSEA Marine Turtle MoU Secretariat, Bangkok*, 2006.

HENDRIX, C.M. *Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários*, Editora Roca, 4 ed., 576p., 2005.

HERBST, L. H. Fibropapillomatosis of marine turtles. *Annu. Rev. Fish. Dis.*, 4, 389-425, 1994.

HERBST, L.H.; JACOBSON, E.R. Practical approaches for studying sea turtle health and disease. In: LUTZ, P.L.; MUSICK, J.A.; WYNEKEN, J. *The Biology of Sea Turtles*. Boca Raton: CRC Press, v.2, p. 384-410, 2003.

HIRTH H.F. Synopsis of the biological data on the green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758). *Biological Report*, n. 97, Washington, USA: US Fish and Wildlife Service, 1997.

HORTA, P.A.; AMÂNCIO, E.; COIMBRA, C.S.; OLIVEIRA, E.C. Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas brasileiras. *Hoehnea* 28:243–265, 2001.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review, *Mutation Research*, v.277, p.91-138, 1992.

JACOBSON, E. R. Collecting and processing blood from sea turtles for hematologic and plasma biochemical determinations. In: *Report of the sea turtles health assessment workshop*, Charleston, USA, p. 24-31, 2007.

JAIN, N.C. Schalm's veterinary hematology. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 1221p.

JESSOP, T.S.; HAMANN, M.; LIMPUS, C.J. Body condition and physiological changes in male green turtles during migration and breeding. *Marine Ecology Progress Series* 276: 281-288, 2004.

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. *J Comp Pathol* 139:218–225, 2008.

KARAHALIL, B. The Micronucleus Assay in Exfoliated Buccal Cells: Application to Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 442, n.1, p. 29-35, 1999.

LABRADA-MARTAGÓN, V.; MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, L.C.; MANGEL, M.; ZENTENO-SAVÍN, T. Applying generalized linear models as an explanatory tool of sex steroids, thyroid

hormones and their relationships with environmental and physiologic factors in immature East Pacific green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. v. 166, Issue 1, p. 91–100, 2013.

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. *Dis. Aquat. Organ*, 37, 89-97, 1999.

LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*, v.46, n.2, p.182-186, 2003.

BRENES CHAVES, L.; BERROCAL, A.; MENESES, A.I.; SÁNCHEZ, C.J.; VÁSQUEZ, C.M.O. Study on the etiology of fibropapillomatosis of olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*) nesting in the National Wildlife Refuge at Ostional, Guanacaste, Costa Rica. *Rev. Mar. Cost.* v. 5: 119-134, 2013.

LESSA, D.A.B. *Doença Inflamatória das Vias Aéreas (DIVA) em equinos de policiamento na Cidade do Rio de Janeiro, RJ: estudo clínico e da atividade macrófaga alveolar*. Tese (doutorado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 102 f. 2003

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. *Arch. Virol.* 145, 1885-1893, 2000.

MARCOVALDI, M.A.; MARCOVALDI, G.G. Marine turtles of Brazil: the history and structure of Projeto TAMAR-IBAMA. *Biol Conser* 1999; 91: 35-41.

MARIA, V.L.; CORREIA, A.C.; SANTOS, M.A. Genotoxic and hepatic biotransformation responses induced by the overflow of pulp mill and secondary-treated effluents on *Anguilla anguilla* L., *Ecotoxicology Environmental Safety*, v.55, p.126-137, 2003.

MASCARENHAS, R.; IVERSON, P.J. Fibropapillomatosis in Stranded Green Turtles (*Chelonia mydas*) in Paraíba State, Northeastern Brazil: Evidence of a Brazilian Epizootic? *Marine Turtle Newsletter*, v.120, p.3-6, 2008.

MATSUMOTO, S. T; MANTOVANI, M. S; MALAGUTTII, M. I. A; DIAS, A. L; FONSECA, I. C; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in on root-tips. *Genetic and Molecular Biology*, v.29, n.1, p. 148-158, 2006.

MATUSHIMA, E.R. 2003. *Fibropapilomas em tartarugas marinhas: aspectos histológicos, imuno-histoquímicos e ultra-estruturais*. São Paulo, SP. Tese de Livre Docência. Universidade de São Paulo, São Paulo, 113 p.

MATUSHIMA, E.R.; LONGATTO FILHO, A.; DI LORETTO, C.; KANAMURA, C.T.; SINHORINI, I.L.; GALLO, B.; BAPTISTOTTE, C. Cutaneous papillomas of Green turtles: a morphological, ultra-structural and immunohistochemical study in Brazilian specimens. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38 (2): 51-54, 2001.

MCEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and behavior*, 43(1), 2-15, 2003.

MCGOWAN, C. Clinical pathology in the racing horse: the role of clinical pathology in assessing fitness and performance in the racehorse. **Vet. Clin. Equine.**, n.24, p. 405-421, 2008.

MCKEEVER, K. H. The endocrine system and the challenge of exercise. **Vet. Clin. Equine.**, n.18, p. 321-353, 2002.

MENESES, A. I.; VILLALOBOS, J. E.; SANCHO, E. *Manual de hematología y química clínica en medicina veterinaria*. Heredia, Costa Rica: EUNA, 1993.

MEYERS-SHONE, L.; WALTON, B.T. Turtles as monitors of chemical contaminants in the environment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.135, p.93–152, 1994.

MOBERG, G.P. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg, G.P.; Mench, J.A. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI Publishing, 2000.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9:211–268, 1999.

MONEZI, T.A.; MULLER, N.M.G.; MATUSHIMA, E.R.; ROSSI, S.; RONDON, M.; MEHNERT, D.U. Detecção de herpesvírus em tumor e sangue de tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas* mantidas na base do Projeto TAMAR, Ubatuba-SP, nos anos de 2005 e 2006. *Anais do X Congresso e XV Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens*, p. 21, 2006.

MONSERRAT, J.M.; MARTINEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M.; PINHO, G.L.; CHAVES, I.S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J. & BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiologypart C: Toxicology and Pharmacology*, v.146, n.1, p.221-34, 2007.

MOORE, I. T.; JESSOP, T.S. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Hormones and Behavior* 43.1: 39-47, 2003.

MOREIRA, L.M.P. *Ecologia reprodutiva e estimativa de ninhos da tartaruga verde-aruanã – Chelonia mydas (Linnaeus, 1758) na ilha de Trindade – Espírito Santo – Brasil*. 63p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2003.

MUSICK, J. A.; LIMPUS, C.J. Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. *The biology of sea turtles* 1: 137-163, 1997.

NEAVE, N. *Hormones and behaviour: a psychological approach*. Cambridge University Press, 2008.

NORTON, T.M.; JACOBSON, E.R.; SUNDBERG, J.P. Cutaneous fibropapillomas and renal myxofibroma in a green turtle. *Chelonia mydas*, *J Wildl Dis* 26:265–270, 1990.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, v.567, n.2, p.109-149, 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. *Springer Plus*, 1:35, 2012 .

PANTALEAO, M.; ALCANTARA, A.V.; ALVES J.D.O.; SPANO, M.A. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaraturariver in Brazil. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.47, n.3, p.219-224, 2006.

PAWAR, A. P., DUBAY, K. F., ZURDO, J., CHITI, F., VENDRUSCOLO, M., & DOBSON, C. M. Prediction of “aggregation-prone” and “aggregation-susceptible” regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *Journal of molecular biology*, 350(2), 379-39, 2005.

PEREIRA, T.; Mai, A. C.; Silva, T. F.; Legat, J. F.; Loebmann, D. Capture of Green Sea Turtles, *Chelonia mydas*, in Fish Weirs off the Coast of Piauí, Northeastern Brazil. *Marine Turtle Newsletter*, 132, 6-8, 2012.

PIRES, T. T.; ROSTAN, G.; BITTENCOURT, T. C. C. D.; GUIMARÃES, J. E. Hemograma e bioquímica sérica de tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*) de vida livre e mantidas em cativeiro, no litoral norte da Bahia. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci*, 46(1), 11-18, 2009.

PORTO, J.I.R.; ARAÚJO, C.S.O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test in three Amazonian fish species. *Environmental Research*. Nº 97. p. 287-292, 2005.

POTTINGER, T. G.; CARRICK, T. R.; APPLEBY, A.; YEOMANS, W. E. High blood cortisol levels and low cortisol receptor affinity: Is the chub, *Leuciscus cephalus*, a cortisol-resistant teleost? *Gen. Comp. Endocrinol.* 120:108–117, 2000.

PRICE, E.R.; TODD, T.; WALLACE, B.P.; GUGLIELMO, C.G. Serum triglycerides and β -hydroxybutyrate predict feeding status in green turtles (*Chelonia mydas*): Evaluating a single blood sample method for assessing feeding/fasting in reptiles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. v. 439, p. 176–180, 2013.

PRIETO-TORRES, D.A.; HERNÁNDEZ, J.L.; HENRÍQUEZ, A.R.B.; ALVARADO, M.C.; DÁVILA, M.J. Blood Biochemistry of the Breeding Population of Green Turtles (*Chelonia mydas*) in the Aves Island Wildlife Refuge, Venezuela. *South American Journal of Herpetology*. 8(3):147-154, 2013.

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

QUACKENBUSH, S. L.; WORK, T. M.; BALAZS, G. H.; CASEY, R. N.; ROVNAK, J.; CHAVES, A.; DU TOIT, L.; BAINES, J. D.; PARRISH, C. R.; BOWSER, P. R.; CASEY, J. W. Three closely related herpesviruses are associated with fibropapillomatosis in marine turtles. *Virology*, 246, 392-399, 1998.

R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2006.

RAMIREZ, A.; SALDANHA, P.H. Micronucleus Investigation of Alcoholic Patients with Oral Carcinomas. *Genetics and Molecular Research*, v. 1, n. 3, p. 246-260, 2002.

RICCIARDI, F.; BINELLI, A.; PROVINI, A. Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in zebra mussel for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.63, n.3, p.406-412, 2006.

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

ROSS, K.; COOPER, N.; BIDWELL, J.R.; ELDER, J. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 671-679, 2002.

ROSSI, S. *Estudo do impacto da fibropapilomatose em Chelonia mydas (LINNAEUS, 1758)*. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2007.

SANTOS, C. H. D., FERREIRA JÚNIOR, P. D. Influence of nesting place on incubation of *Dermochelys coriacea* Vandelli, 1761 (Testudines: *Dermochelyidae*) in Reserva Biológica de Comboios, norte do estado Espírito Santo, Brazil. *Biota Neotropica*, 9(3), 413-418, 2009.

SANTOS, M.R.D.; MARTINS, A.S.; BAPTISTOTTE, C. 2006. Valores bioquímicos e hematócrito de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) juvenis selvagens com e sem fibropapilomatose cutânea no Espírito Santo, Brasil. In: X Congresso e XV Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. *Anais...* São Pedro, p. 54.

SANTOS, R. G.; SILVA, M. A.; TOREZANI, E.; BAPTISTOTTE, C.; DA NÓBREGA, F. J.; ANTUNES, H. P.; WORK, T. M.; BALAZS, G. H. Relationship between fibropapillomatosis and environmental quality: a case study with *Chelonia mydas* of Brazil. *Dis. Aquatic Organ*, 89, 87-95, 2010.

SARTO, F. The Micronucleus Assay in Exfoliated Cells of the Human Buccal Mucosa. *Mutagenesis*, Oxford, v. 2, n. 1, p. 11-17, 1987.

SILVA, A.C.; NEPOMUCENO, J.C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) no rio Paranaíba. *Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM*, n.7, p.167-179, 2010.

SILVA, C.C.; VARELA JR. A.S.; BARCAROLLI, I.F.; BIANCHINI, A. Concentrations and distributions of metals in tissues of stranded green sea turtles (*Chelonia mydas*) from the southern Atlantic coast of Brazil. *Science of The Total Environment*. v. 466–467, p. 109–118, 2014.

SOUZA, V.H.E.; SOARES, C.H.L.; CANTAGALLI, L.B.; VICENTINI, V.E.P. Utilização de testes citogenéticos para avaliação de mutagênese ambiental. *Arquivos da Apadec*, v.8, 2004.

SPOTILA, J.R. The Green Eaters. In: *Sea Turtles, A Complete Guide to Their Biology, Behavior and Conservation*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2004.

STACY, B.A.; WELLEHAN, J.F.X; FOLEY, A.M.; COBERLEY, S.S.; HERBST, L.H.; MANIRE, C.A.; GARNER, M.M.;BROOKINS, M.D; CHILDRESS, A.L; JACOBSON, E.R. Two herpesvirus associated with disease in wild Atlantic loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Veterinary Microbiology*, 126: 63-73, 2008.

SWIMMER, J. Y. Biochemical responses to fibropapilloma and captivity in the green turtle. *Journal of Wildlife Diseases* 36.1: 102-110, 2000.

THOMSON, J.A.; HEITHAUS, M.R. Animal-borne video reveals seasonal activity patterns of green sea turtles and the importance of accounting for capture stress in short-term biologging. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. v. 450, p. 15–20, 2014.

THRALL, M. A. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. John Wiley & Sons, 2012.

TITENKO-HOLLAND, N. Quantification of Epithelial Cell Micronuclei by Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) in Mortuary Science Students Exposed to Formaldehyde. *Mutation Research*, Amsterdam, v.371, n. 3-4, p. 237-48, 1996.

TOREZANI, E.; BAPTISTOTTE, C.; MENDES, S.L.; BARATA, P.C.R. Juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) in the effluent discharge channel of a steel plant, Espirito Santo, Brasil, 2000-2006. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, p. 1-14, 2009.

TYRRELL, C.L.; CREE, A. Relationships between corticosterone concentration and season, time of day and confinement in a wild reptile (*tuatara*, *Sphenodon punctatus*). *General and Comparative Endocrinology* 110: 97-108, 1998.

VALVERDE, R. A., WINGARD, S., GÓMEZ, F., TORDOIR, M. T., ORREGO, C. M. Field lethal incubation temperature of olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* embryos at a mass nesting rookery. *Endangered Species Research*, 12(1), 77-86, 2010.

VAN HOUTAN, K.S.; HARGROVE, S.K.; BALAZS, G.H. Land Use, Macroalgae, and a Tumor-Forming Disease in Marine Turtles. *PLoS One* 5:e12900. doi:10.1371/journal.pone.0012900, 2010.

WALLACE, B.P.; JONES, T.T. What makes marine turtles go: A review of metabolic rates and their consequences. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 356, 8–24, 2008.

WELLS, P.G.; DEPLEDGE, M.H.; BUTLER, J.N.; MANOCK, J.J.; KNAP, A.H. Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants - exploiting the potential of rapid biomarker, *Marine Pollution Bulletin*, v.42, n.10, p.799-804, 2001.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. *Physiol Rev.*, July 1, 77:(3) 591-625, 1997.

WHELAN, T.; ESPINOZA, J.; VOLLARREAL, X.; COTTAGOMA, M. Trace metal partitioning in *Thalassia testudinum* and sediments in the Lower Laguna Madre, Texas. *Environment International*, v.31, p.15–24, 2005.

WORK, T.; BALAZS, G. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. *J. Wildlife Dis.*, 35(4), 804-807, 1999.

WORK, T.M.; BALAZS, G.H.; WOLCOTT, M.; MORRIS, R.A. Bacteraemia in free ranging Hawaiian green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis. *Disease of Aquatic Organism*, 53:41-46, 2003.

WORM, B.; BARBIER, E.B.; BEAUMONT, N.; DUFFY, J.E.; FOLKE, C.; HALPERN, B.S.; JACKSON, J.B.C.; LOTZE, H.K.; MICHELI, F.; PALUMBI, S.R.; SALA, E.; SELKOE, K.A.; STACHOWICZ, J.J.; WATSON, R. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science*, 314: 787-790, 2006.

ZWARG, T.; ROSSI, S.; SANCHES, T.C.; ZI-MOVSKI, J.M.; CASAGRANDE, R.A.; CESAR, M.O.; WERNEK, M.R.; MATUSHIMA, E.R. 2006. Avaliação do perfil hematológico de tartaruga verde (*Chelonia mydas*) (*Testudines, Chelonidae*) com e sem fibropapilomatose do litoral norte do Estado de São Paulo. In: X Congresso e XV Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. Anais... São Pedro, p. 35.

ANEXO I

DADOS BRUTOS POR GRUPO (G1, G2 E G3) DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE GLICOSE, LACTATO E CORTISOL.

G1 – GRUPO DE ANIMAIS DE FERNANDO DE NORONHA/PE					
Identificação	Tumores	Glicose (mg/dL)	Lactato (mg/dL)	Lactato (mmol/L)	Cortisol (ng/mL)
Animal 1	Não	68,6	37,4	4,2	28,0
Animal 2	Não	68,6	22,1	2,5	11,7
Animal 3	Não	72,8	170,6	18,9	10,7
Animal 4	Não	40,7	135,4	15,0	23,4
Animal 5	Não	62,7	152,0	16,9	109,8
Animal 6	Não	31,7	55,9	6,2	9,9
Animal 7	Não	50,1	118,7	13,2	8,3
Animal 8	Não	65,7	128,5	14,3	39,8
Animal 9	Não	66,4	25,5	2,8	3,9
Animal 10	Não	69,5	148,9	16,5	10,3
Animal 11	Não	56,6	128,0	14,2	14,1
Animal 12	Não	51,4	102,6	11,4	16,9
Animal 13	Não	67,3	122,6	13,6	4,2
Animal 14	Não	64,3	105,6	11,7	23,0
Animal 15	Não	60,8	92,6	10,3	44,9
Animal 16	Não	53,0	91,3	10,1	15,7
Animal 17	Não	58,5	131,4	14,6	53,2
Animal 18	Não	82,5	85,1	9,4	55,2
Animal 19	Não	71,2	123,6	13,7	2,2
Animal 20	Não	43,0	103,6	11,5	5,0
Animal 21	Não	67,6	55,5	6,2	51,8
Animal 22	Não	67,6	128,9	14,3	38,9
Animal 23	Não	79,3	98,7	11,0	115,6
Animal 24	Não	60,8	57,7	6,4	7,8
Animal 25	Não	63,7	78,0	8,7	7,3
Animal 26	Não	45,3	89,6	9,9	31,3
Animal 27	Não	56,3	87,7	9,7	0,2

Animal 28	Não	70,9	98,5	10,9	19,8
Animal 29	Não	58,5	79,3	8,8	74,4
Animal 30	Não	45,9	86,6	9,6	16,9
Animal 31	Não	61,8	153,1	17,0	15,0
Animal 32	Não	59,2	119,3	13,2	45,8
Animal 33	Não	55,3	98,2	10,9	33,1
Animal 34	Não	30,7	69,5	7,7	4,5
MÉDIA	-	59,7	99,5	11,0	28,0
DESVIO	-	12,1	36,2	4,0	28,2

G2 - GRUPO DE ANIMAIS DE VITÓRIA/ES SEM PAPILOMA					
Identificação	Tumores	Glicose (mg/dL)	Lactato (mg/dL)	Lactato (mmol/L)	Cortisol (ng/mL)
Animal 1	Não	80,6	16,9	1,9	5,38
Animal 2	Não	65,4	9,5	1,1	5,73
Animal 3	Não	85,1	74,8	8,3	5,05
Animal 4	Não	62,7	154,9	17,2	10,82
Animal 5	Não	71,1	18,6	2,1	0,46
Animal 6	Não	85,1	18,4	2,0	1,62
Animal 7	Não	66,6	125,0	13,9	5,29
Animal 8	Não	85,1	94,3	10,5	7,55
Animal 9	Não	63,1	58,7	6,5	5,88
Animal 10	Não	92,8	160,3	17,8	8,61
Animal 11	Não	77,3	23,9	2,7	7,62
Animal 12	Não	82,7	36,3	4,0	11,79
Animal 13	Não	86,7	162,3	18,0	1,28
Animal 14	Não	73,9	18,4	2,0	7,43
Animal 15	Não	73,1	100,9	11,2	9,80
Animal 16	Não	82,9	99,4	11,0	9,90
Animal 17	Não	87,3	5,9	0,7	6,16
Animal 18	Não	65,1	18,9	2,1	2,33

Animal 19	Não	47,5	74,8	8,3	6,38
Animal 20	Não	68,6	74,9	8,3	3,79
Animal 21	Não	71,8	119,4	13,3	3,23
Animal 22	Não	77,7	79,5	8,8	2,93
Animal 23	Não	57,3	29,7	3,3	1,59
Animal 24	Não	73,6	22,8	2,5	2,02
Animal 25	Não	73,9	7,7	0,9	2,07
Animal 26	Não	65,4	24,5	2,7	0,10
Animal 27	Não	67,3	30,2	3,4	6,48
Animal 28	Não	66,4	18,4	2,0	5,04
Animal 29	Não	73,9	23,4	2,6	1,14
Animal 30	Não	65,4	59,4	6,6	0,55
Animal 31	Não	64,8	6,3	0,7	0,62
Animal 32	Não	65,4	37,1	4,1	1,96
Animal 33	Não	61,8	58,9	6,5	0,59
Animal 34	Não	76,1	32,5	3,6	1,16
Animal 35	Não	92,4	24,3	2,7	0,94
Animal 36	Não	83,9	70,6	7,8	7,53
Animal 37	Não	81,5	36,1	4,0	4,01
Animal 38	Não	57,0	38,1	4,2	2,63
Animal 39	Não	73,1	120,0	13,3	6,43
Animal 40	Não	84,9	32,1	3,6	1,16
Animal 41	Não	65,8	6,5	0,7	6,74
Animal 42	Não	65,1	57,9	6,4	0,97
Animal 43	Não	68,5	49,7	5,5	7,15
Animal 44	Não	56,4	34,9	3,9	0,10
Animal 45	Não	66,2	81,2	9,0	9,00
Animal 46	Não	66,2	59,4	6,6	5,64
Animal 47	Não	66,7	37,2	4,1	7,01
Animal 48	Não	64,5	40,7	4,5	2,51
Animal 49	Não	60,0	35,0	3,9	0,69
Animal 50	Não	55,1	106,9	11,9	1,66
Animal 51	Não	72,1	19,8	2,2	10,83

Animal 52	Não	62,7	9,4	1,0	5,34
Animal 53	Não	80,9	31,3	3,5	20,15
Animal 54	Não	53,6	45,4	5,0	3,93
Animal 55	Não	71,5	60,5	6,7	10,36
Animal 56	Não	53,8	39,8	4,4	5,90
Animal 57	Não	84,3	28,1	3,1	2,25
Animal 58	Não	76,7	15,1	1,7	2,67
Animal 59	Não	90,3	29,5	3,3	3,76
Animal 60	Não	82,4	77,3	8,6	3,10
Animal 61	Não	85,6	121,1	13,4	4,21
Animal 62	Não	67,9	76,4	8,5	4,26
Animal 63	Não	64,2	34,6	3,8	1,61
Animal 64	Não	66,7	24,6	2,7	1,64
Animal 65	Não	84,2	23,2	2,6	2,77
Animal 66	Não	55,1	110,9	12,3	1,80
MÉDIA	-	71,6	52,6	5,8	4,6
DESVIO	-	10,7	40,0	4,4	3,7

G3 – GRUPO DE ANIMAIS DE VITÓRIA/ES COM FIBROPAPILOMA					
Identificação	Tumores	Glicose (mg/dL)	Lactato (mg/dL)	Lactato (mmol/L)	Cortisol (ng/mL)
Animal 1	Sim	67,6	112,2	12,5	34,3
Animal 2	Sim	66,2	124,0	13,8	27,7
Animal 3	Sim	70,2	88,6	9,8	14,6
Animal 4	Sim	67,7	99,2	11,0	28,9
Animal 5	Sim	63,6	84,4	9,4	12,7
Animal 6	Sim	68,6	112,5	12,5	33,9
Animal 7	Sim	55,6	123,6	13,7	36,3
Animal 8	Sim	65,7	78,9	8,8	23,4
Animal 9	Sim	66,2	88,2	9,8	23,2
Animal 10	Sim	68,6	77,5	8,6	14,2
Animal 11	Sim	66,9	88,9	9,9	13,9
Animal 12	Sim	67,0	45,6	5,1	10,2
Animal 13	Sim	64,5	141,2	15,7	32
Animal 14	Sim	68,5	101,5	11,3	22,6
Animal 15	Sim	88,8	55,8	6,2	9,5
Animal 16	Sim	67,8	53,6	5,9	12,7
Animal 17	Sim	81,9	87,6	9,7	19,2
Animal 18	Sim	77,3	89,4	9,9	14,3
Animal 19	Sim	72,2	123,4	13,7	35,6
Animal 20	Sim	79,7	63,4	7,0	24,3
Animal 21	Sim	68,9	24,2	2,7	22,3
Animal 22	Sim	67,2	42,2	4,7	12,3
Animal 23	Sim	71,1	83,6	9,3	13,3
Animal 24	Sim	76,8	128,2	14,2	30,2
Animal 25	Sim	83,3	55,7	6,2	9,2
Animal 26	Sim	72,3	34,5	3,8	12,2
Animal 27	Sim	86,6	101,2	11,2	25,5
Animal 28	Sim	71,0	78,8	8,7	11,2
Animal 29	Sim	68,9	108,1	12,0	36,2
Animal 30	Sim	66,7	80,3	8,9	19,2

Animal 31	Sim	85,0	109,2	12,1	27,7
Animal 32	Sim	67,2	75,8	8,4	9,7
Animal 33	Sim	68,2	28,9	3,2	22,1
Animal 34	Sim	84,5	66,8	7,4	39,5
Animal 35	Sim	73,5	69,8	7,7	31,9
Animal 36	Sim	82,7	69,6	7,7	17,0
Animal 37	Sim	60,9	80,3	8,9	80,8
Animal 38	Sim	64,8	24,9	2,8	8,08
Animal 39	Sim	81,5	30,6	3,4	10,5
Animal 40	Sim	65,8	37,5	4,2	18,5
MÉDIA	-	71,5	79,2	8,8	22,5
DESVIO	-	7,7	31,0	3,4	13,2

ANEXO II

DADOS BRUTOS POR GRUPO (G1, G2 E G3) DOS PARÂMETROS HEMATIMÉTRICOS E TESTE DE MICRONÚCLEO ERITROCITÁRIO

G1 - GRUPO DE ANIMAIS DE FERNANDO DE NORONHA/PE														
Identificação	VG (%)	Hemácias (x10 ⁶ /μL)	Hemog. (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (%)	Leucócito (/μL)	Heterófilo (/μL)	Linfócito (/μL)	Monócito (/μL)	Eosinófilo (/μL)	Basófilo (/μL)	Trombócito (/μL)	Micronúcleo (%)	Micronúcleo (/μL)
Animal 1	34	0,540	9,4	630	28	10500	8000	340	1200	950	10	9500	0,5%	0,0027
Animal 2	28	0,450	7,9	622	28	12850	10450	345	1608	447	0	10500	1,0%	0,0045
Animal 3	30	0,523	7,7	574	26	16200	14500	420	1150	130	0	12000	0,0%	0,0000
Animal 4	30	0,49	8,5	612	28	8500	6500	850	1050	100	0	24500	1,0%	0,0049
Animal 5	28	0,478	7,6	586	27	7800	6000	580	1100	120	0	12000	2,0%	0,0096
Animal 6	30	0,567	8,0	529	27	10200	7800	2000	340	40	20	12500	0,0%	0,0000
Animal 7	29	0,499	8,0	581	28	5600	4000	870	640	90	0	20400	1,0%	0,0050
Animal 8	32	0,563	9,2	568	29	7800	4500	560	1250	1450	40	28500	0,0%	0,0000
Animal 9	27	0,512	7,9	527	29	8200	6000	600	980	570	50	24500	2,0%	0,0102
Animal 10	31	0,519	8,7	597	28	7500	5600	230	1200	470	0	18400	1,0%	0,0052
Animal 11	35	0,561	9,0	624	26	10200	8200	423	1520	57	0	12800	0,0%	0,0000
Animal 12	32	0,612	8,1	523	25	5000	3400	520	980	100	0	28000	0,5%	0,0031
Animal 13	32	0,514	8,2	623	26	5400	3650	650	660	400	40	25600	2,0%	0,0103
Animal 14	31	0,556	8,8	558	28	8000	4600	780	1250	1350	20	24500	0,5%	0,0028
Animal 15	26	0,423	7,4	615	28	4500	3800	360	300	40	0	20800	2,0%	0,0085
Animal 16	38	0,623	9,9	610	26	3500	2400	335	550	215	0	32000	1,0%	0,0062
Animal 17	31	0,561	8,2	553	26	6300	3450	450	1650	700	50	23800	0,0%	0,0000

Animal 18	33	0,488	8,7	676	26	7800	5000	660	1350	750	40	25600	0,0%	0,0000
Animal 19	25	0,453	6,7	552	27	8400	6400	780	880	340	0	28000	0,5%	0,0023
Animal 20	31	0,561	7,8	553	25	8500	6500	1400	350	250	0	21000	0,5%	0,0028
Animal 21	32	0,471	8,7	679	27	6700	4800	1200	550	130	20	18500	0,0%	0,0000
Animal 22	38	0,666	9,8	571	26	8300	6700	250	980	360	10	14500	1,0%	0,0067
Animal 23	27	0,416	7,8	649	29	7200	6000	340	540	300	20	16700	1,0%	0,0042
G1 - GRUPO DE ANIMAIS DE FERNANDO DE NORONHA/PE														
Identificação	VG (%)	Hemácias (x10⁶/µL)	Hemog. (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (%)	Leucócito (/µL)	Heterófilo (/µL)	Linfócito (/µL)	Monócito (/µL)	Eosinófilo (/µL)	Basófilo (/µL)	Trombócito (/µL)	Micronúcleo (%)	Micronúcleo (/µL)
Animal 24	30	0,451	7,8	665	26	7200	5800	480	650	270	0	18400	3,0%	0,0135
Animal 25	31	0,461	8,3	672	27	4500	2500	630	780	580	10	21000	0,0%	0,0000
Animal 26	31	0,499	8,4	621	27	8200	5500	700	1450	550	0	21800	1,0%	0,0050
Animal 27	29	0,489	7,9	593	27	7500	5000	550	1250	640	60	17500	2,0%	0,0098
Animal 28	30	0,523	8,0	574	27	8000	6400	240	1150	210	0	9500	8,0%	0,0418
Animal 29	27	0,423	7,9	638	29	7500	5600	420	1300	180	0	10500	3,0%	0,0127
Animal 30	31	0,534	8,0	581	26	4500	3800	380	150	170	0	12800	0,5%	0,0027
Animal 31	27	0,423	7,1	638	26	10000	8500	200	950	330	20	28000	0,0%	0,0000
Animal 32	39	0,569	10,2	685	26	5400	3800	430	860	300	10	17300	2,0%	0,0114
Animal 33	24	0,412	6,5	583	27	6000	4550	480	560	410	0	12800	1,0%	0,0041
Animal 34	29	0,423	8,0	686	28	6800	3850	340	1350	1260	0	10500	0,0%	0,0000
MÉDIA	31	0,507	8,2	604	27	7663	5693	582	957	419	12	18962	0,01	0,0056
DESVIO	3,5	0,064	0,8	47,3	1,2	2493,1	2374,0	362,9	396,8	369,8	17,9	6533,4	0,01	0,0076

G2 - GRUPO DE ANIMAIS DE VITÓRIA/ES SEM PAPILOMA

Identificação	VG (%)	Hemácias (x10⁶/μL)	Hemog. (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (%)	Leucócitos (/μL)	Heterófilos (/μL)	Linfócitos (/μL)	Monócitos (/μL)	Eosinófilos (/μL)	Basófilos (/μL)	Trombócitos (/μL)	Micronúcleo (%)	Micronúcleo (/μL)
Animal 1	44	0,740	12,8	595	29	3560	2200	250	900	210	0	12000	3%	0,022
Animal 2	40	0,620	11,0	645	28	4750	3800	750	200	0	0	8500	6%	0,037
Animal 3	35	0,470	9,5	745	27	6000	4500	850	500	150	0	7000	2%	0,009
Animal 4	44	0,560	11,0	786	25	5600	3800	600	800	380	20	12000	8%	0,045
Animal 5	44	0,450	11,5	978	26	3500	2400	560	500	40	0	11000	3%	0,014
Animal 6	46	0,810	12,2	568	27	2500	1300	850	350	0	0	9500	1%	0,008
Animal 7	42	0,604	10,3	695	25	6000	3250	580	1800	350	20	8500	3%	0,018
Animal 8	40	0,770	10,0	519	25	5250	3500	1200	500	50	0	8800	22%	0,169
Animal 9	40	0,635	10,8	630	27	2200	1100	890	210	0	0	12500	15%	0,095
Animal 10	44	0,740	12,8	595	29	3250	1340	1100	600	210	0	18400	33%	0,244
Animal 11	40	0,620	11,0	645	28	4750	3050	1240	400	60	0	8500	3%	0,019
Animal 12	35	0,470	9,4	745	27	6000	2800	2100	800	280	20	9000	5%	0,024
Animal 13	36	0,645	10,3	558	29	9250	6500	2400	340	10	0	12000	9%	0,058
Animal 14	45	0,845	11,7	533	26	3750	1400	1850	480	20	0	10500	12%	0,101
Animal 15	44	0,670	11,0	657	25	2500	1200	850	400	50	0	5600	11%	0,074
Animal 16	44	0,650	11,5	677	26	3500	2000	950	400	150	0	6400	5%	0,033
Animal 17	46	0,810	12,2	568	27	3500	2100	1050	340	10	0	8000	8%	0,065
Animal 18	42	0,605	10,3	694	25	4500	2800	800	800	100	0	5300	8%	0,048
Animal 19	38	0,505	10,4	752	27	4250	3100	940	210	0	0	6400	6%	0,030
Animal 20	44	0,695	11,1	633	25	4750	2800	900	590	400	60	8200	2%	0,014

Animal 21	37	0,610	9,3	607	25	7500	4300	1200	1450	550	0	10400	1%	0,006
Animal 22	35	0,605	9,5	579	27	5250	3000	950	1100	200	0	10200	3%	0,018
Animal 23	45	0,630	12,3	714	27	4000	2800	850	350	0	0	14000	9%	0,057
Animal 24	39	0,865	10,0	451	26	9000	6500	1250	1000	250	0	7500	12%	0,104
G2 - GRUPO DE ANIMAIS DE VITÓRIA/ES SEM PAPILOMA														
Identificação	VG (%)	Hemácias (x10⁶/µL)	Hemog. (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (%)	Leucócitos (/µL)	Heterófilos (/µL)	Linfócitos (/µL)	Monócitos (/µL)	Eosinófilos (/µL)	Basófilos (/µL)	Trombócitos (/µL)	Micronúcleo (%)	Micronúcleo (/µL)
Animal 25	42	0,745	10,7	564	25	5750	3400	1200	1000	150	0	13000	10%	0,075
Animal 26	48	0,640	13,0	750	27	5500	4200	1050	250	0	0	8800	4%	0,026
Animal 27	43	0,735	12,6	585	29	6500	3000	2100	1300	100	0	9500	4%	0,029
Animal 28	46	0,605	11,7	760	25	6550	3200	1980	1000	370	0	9000	21%	0,127
Animal 29	44	0,770	12,4	571	28	3000	2000	750	250	0	0	5600	8%	0,062
Animal 30	33	0,510	9,8	647	30	4500	2900	980	600	20	0	7500	18%	0,092
Animal 31	46	0,615	13,6	748	30	3750	2700	650	350	50	0	8000	4%	0,025
Animal 32	42	0,680	10,9	618	26	6000	3000	1200	1500	300	0	10400	2%	0,014
Animal 33	37	0,621	8,8	596	24	4750	2500	850	1200	200	0	8000	32%	0,199
Animal 34	42	0,810	10,0	519	24	3750	3000	450	300	0	0	10400	4%	0,032
Animal 35	49	0,630	12,3	778	25	2250	1200	340	650	60	0	7500	3%	0,019
Animal 36	44	0,620	12,7	710	29	5250	3500	1000	750	0	0	6800	2%	0,012
Animal 37	49	0,720	12,9	681	26	6750	4300	1150	1300	0	0	8000	3%	0,022
Animal 38	40	0,570	11,4	702	29	4750	3000	900	800	50	0	11500	8%	0,046
Animal 39	35	0,720	10,3	486	29	6750	5000	450	1000	260	40	15000	22%	0,158
Animal 40	44	0,665	12,5	662	28	4500	3200	680	500	120	0	18000	13%	0,086

Animal 41	48	0,795	13,1	604	27	6500	4300	1200	900	100	0	20200	4%	0,032
Animal 42	43	0,855	11,4	503	27	7500	4500	1840	1000	160	0	13500	8%	0,068
Animal 43	35	0,525	9,3	667	27	4250	3000	900	300	50	0	18000	8%	0,042
Animal 44	40	0,656	10,5	610	26	3250	2500	240	510	0	0	22000	5%	0,033
Animal 45	40	0,650	10,3	615	26	4250	2800	800	650	0	0	18000	33%	0,215
Animal 46	50	0,850	12,3	588	25	3500	2000	850	600	50	0	8000	8%	0,068
Animal 47	27	0,480	7,2	563	27	4250	2600	950	600	100	0	12600	9%	0,043
Animal 48	45	0,710	12,2	634	27	2000	1200	540	260	0	0	22000	12%	0,085
Animal 49	47	0,700	13,7	671	29	11750	8400	2300	1000	50	0	24500	14%	0,098
Animal 50	47	0,785	13,5	599	29	6500	4100	1650	750	0	0	12000	4%	0,031

G2 - GRUPO DE ANIMAIS DE VITÓRIA/ES SEM PAPILOMA

Identificação	VG (%)	Hemácias (x10⁶/μL)	Hemog. (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (%)	Leucócitos (/μL)	Heterófilos (/μL)	Linfócitos (/μL)	Monócitos (/μL)	Eosinófilos (/μL)	Basófilos (/μL)	Trombócitos (/μL)	Micronúcleo (%)	Micronúcleo (/μL)
Animal 51	48	0,605	13,1	793	27	5000	3000	1200	450	350	0	12500	5%	0,030
Animal 52	48	0,745	12,6	644	26	7250	4400	1450	1100	300	0	14500	5%	0,037
Animal 53	44	0,645	10,9	682	25	3250	2300	800	150	0	0	8000	8%	0,052
Animal 54	48	0,655	12,7	733	26	4500	3300	860	340	0	0	7500	12%	0,079
Animal 55	40	0,585	12,1	684	30	4000	2300	1250	450	0	0	8500	18%	0,105
Animal 56	46	0,677	12,1	679	26	6500	4400	1350	600	150	0	8000	21%	0,142
Animal 57	44	0,564	11,6	780	26	7250	3900	1800	1200	350	0	5600	22%	0,124
Animal 58	40	0,520	10,2	769	26	8000	5000	1450	1000	510	40	8500	2%	0,010
Animal 59	42	0,654	10,7	642	25	8500	5500	1250	1450	300	0	9400	4%	0,026
Animal 60	44	0,666	11,6	661	26	6800	5000	1100	400	300	0	10100	4%	0,027

Animal 61	40	0,745	11,0	537	28	7000	4500	1350	700	450	0	8400	8%	0,060
Animal 62	38	0,655	11,2	580	29	5250	4000	900	190	160	0	10600	3%	0,020
Animal 63	40	0,605	11,5	661	29	6500	4900	1200	380	20	0	11000	21%	0,127
Animal 64	38	0,595	12,2	639	32	4500	3000	850	500	150	0	12400	10%	0,060
Animal 65	44	0,680	10,8	647	25	6500	4400	1200	650	250	0	6800	3%	0,020
Animal 66	42	0,690	12,0	609	29	4500	3000	950	230	300	20	10400	6%	0,041
MÉDIA	42	0,660	11,3	648	27	5219	3332	1075	669	140	3	10761	9%	0,061
DESVIO	4,5	0,099	1,3	88,9	1,7	1869	1364	465	379	147	11	4237	8%	0,052

G3 - GRUPO DE ANIMAIS DE VITÓRIA/ES COM PAPILOMA														
Identificação	VG (%)	Hemácias (x10 ⁶ /μL)	Hemog. (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (%)	Leucócitos (/μL)	Heterófilos (/μL)	Linfócitos (/μL)	Monócitos (/μL)	Eosinófilos (/μL)	Basófilos (/μL)	Trombócitos (/μL)	Micronúcleo (%)	Micronúcleo (/μL)
Animal 1	47	0,870	13,3	540	28	500	350	100	50	0	0	10500	32%	0,278
Animal 2	44	0,875	10,5	503	24	500	240	160	40	60	0	8500	22%	0,193
Animal 3	47	0,760	12,1	618	26	1000	550	340	100	10	0	7000	34%	0,258
Animal 4	46	0,675	11,3	681	25	2500	1450	880	150	20	0	5750	12%	0,081
Animal 5	43	0,625	10,6	688	25	3000	2200	500	140	160	0	12250	33%	0,206
Animal 6	42	0,660	12,2	636	29	1500	1000	340	150	10	0	12250	31%	0,205
Animal 7	42	0,845	10,4	497	25	3500	2300	750	300	150	0	3750	8%	0,068
Animal 8	43	0,570	10,9	754	25	2500	1800	300	340	60	0	8250	16%	0,091
Animal 9	21	0,365	5,1	575	24	5000	3400	650	750	160	40	8000	21%	0,077
Animal 10	44	0,755	12,2	583	28	4500	3200	1000	180	100	20	12250	18%	0,136
Animal 11	40	0,640	9,9	625	25	1250	980	150	120	0	0	12000	33%	0,211
Animal 12	11	0,165	3,0	667	27	7000	4300	1250	1100	350	0	7500	34%	0,056
Animal 13	49	0,740	12,2	662	25	4000	2500	550	900	50	0	4500	32%	0,237
Animal 14	55	0,790	15,0	696	27	1750	950	450	300	50	0	8000	28%	0,221
Animal 15	25	0,530	7,6	472	30	8500	4600	2000	1500	400	0	7000	22%	0,117
Animal 16	43	0,650	12,4	662	29	1750	1050	450	200	50	0	8750	33%	0,215
Animal 17	43	0,670	12,3	642	29	2250	1850	240	100	50	10	15750	18%	0,121
Animal 18	53	0,770	15,4	688	29	5500	3400	1280	550	250	20	18000	12%	0,092
Animal 19	44	0,750	12,1	587	28	11750	8400	1850	800	700	0	13750	22%	0,165

Animal 20	41	0,875	11,3	469	28	2750	2200	200	280	70	0	12750	31%	0,271
Animal 21	46	0,620	10,7	742	23	3000	1350	650	650	350	0	3250	12%	0,074
Animal 22	52	0,720	12,0	722	23	1500	1100	320	80	0	0	8250	10%	0,072
Animal 23	43	0,735	11,9	585	28	3500	1350	1650	300	180	20	13000	22%	0,162
Animal 24	48	0,725	12,4	662	26	2250	1050	740	380	80	0	17250	28%	0,203
Animal 25	45	0,660	11,4	682	25	3250	2200	450	450	150	0	6000	21%	0,139
Animal 26	48	0,605	12,7	793	26	1750	1080	320	350	0	0	8500	31%	0,188
G3 - GRUPO DE ANIMAIS DE VITÓRIA/ES COM PAPILOMA														
Identificação	VG (%)	Hemácias (x10⁶/μL)	Hemog. (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (%)	Leucócitos (/μL)	Heterófilos (/μL)	Linfócitos (/μL)	Monócitos (/μL)	Eosinófilos (/μL)	Basófilos (/μL)	Trombócitos (/μL)	Micronúcleo (%)	Micronúcleo (/μL)
Animal 27	48	0,845	12,5	568	26	2750	1200	430	750	350	20	10500	22%	0,186
Animal 28	57	0,878	16,1	649	28	1250	880	250	120	0	0	14250	18%	0,158
Animal 29	38	0,605	10,4	628	27	8500	5500	1300	880	800	20	7500	34%	0,206
Animal 30	32	0,640	8,5	500	27	8250	4500	1740	1280	730	0	8250	41%	0,262
Animal 31	38	0,615	10,0	618	26	6450	4500	1230	480	240	0	13000	22%	0,135
Animal 32	33	0,540	8,8	611	27	3450	2800	350	220	80	0	11600	21%	0,113
Animal 33	35	0,450	9,6	778	27	3250	2500	340	380	30	0	8500	44%	0,198
Animal 34	31	0,513	9,0	604	29	2500	1200	350	900	50	0	12250	23%	0,118
Animal 35	31	0,480	8,2	646	26	1800	800	320	340	340	0	11500	18%	0,086
Animal 36	33	0,560	8,8	589	27	4500	3400	430	320	340	10	10540	39%	0,218
Animal 37	34	0,640	8,9	531	26	3000	2100	360	380	160	0	12000	38%	0,243
Animal 38	32	0,560	10,0	571	31	5500	3000	1100	800	560	40	8950	33%	0,185
Animal 39	37	0,677	10,2	547	28	2500	1800	320	280	100	0	10200	22%	0,149

Animal 40	33	0,565	10,1	584	31	1250	660	250	340	0	0	12500	28%	0,158
MÉDIA	40	0,655	10,8	621	27	3530	2242	659	443	181	5	10107	25%	0,164
DESVIO	9,2	0,147	2,5	80,4	2,0	2495	1654	511	353	212	11	3408	9%	0,063

ANEXO III

Protocolo de extração com solução salina adaptado por David Vieites - U.C. Berkeley

Soluções:

- Tampão de extração*
- ddH₂O estéril
- SDS 10%
- Proteinase K 20mg/ml
- NaCl (5M)
- Isopropanol
- Etanol 80%

Procedimentos:

1. Com auxílio de uma pinça e um bisturi, corte o tecido em cima de um Parafilm apoiado em uma placa de Petri. Use água sanitária e álcool para esterilizar a pinça e o bisturi cada vez que trocar de tecido. Adicione o tecido picado a um tubo de 1,5mL.
2. Adicionar a solução de lise aos tubos (410µL de buffer de extração + 80µL SDS 10% + 15µL proteinase K (20µ/µL). (opcional: + 2µL Rnase A). OBS: Se for deixar os tecidos digerindo overnight, acrescentar apenas 10µL de proteinase K.
3. Incubar a 55°C por aproximadamente 2 horas (vortexar a cada 10 minutos) até a digestão do tecido.
4. Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos.
 - Transferir o sobrenadante (líquido) para um novo tubo de 1,5mL.
 - Adicionar 180µL NaCl (5M).
 - Inverter o tubo 50 vezes para homogeneizar. Um precipitado branco será formado.

Se a coloração do precipitado não for branca, o reagente NaCl está velho.

5. Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos.
 - Transferir o sobrenadante para um novo tubo (manter em um bloco resfriado) e adicionar

1.000µL de isopropanol gelado;

- Misturar gentilmente.

6. Centrifugar a 13.000 rpm por 7 minutos.

- Descartar sobrenadante.

- Adicionar 250µL etanol 80%.

- Inverter 50 vezes para misturar.

7. Repetir o passo nº6.

8. Centrifugar a 13.000 rpm por 7 minutos.

- Descartar sobrenadante.

- Remover álcool completamente no banho a 50-55°C.

9. Ressuspender o DNA em 50-100µL de água ultrapura ou tampão TE. OBS: Sem pellet colocar 25µL. Com muito pellet colocar até 200µL.

10. Deixar na geladeira overnight (4°C) para diluir a pellet.

* Tampão (Buffer) de Extração (Autoclavar):

– 1M Tris (pH= 8) 0.5mL

– 5MNaCl 1.0mL

– 0.5M EDTA (pH= 8) 1.0mL

– ddH2O estéril 47.5mL

Observações: Os reagentes e princípios aplicados são os de Bruford et al. (1992). David Vieites adequou algumas quantidades, materiais e procedimentos para facilitar a extração.

BRUFORD, M. W.; HANOTTE, O.; BROOKFIELD, J. F. Y.; BURKE, T. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Molecular genetic analyses of populations: A Practical Approach. HOELZEL, A. R. (Ed.). Oxford: IRL Press, 1992. p. 225-269.

ANEXO IV

COLETAS DE SANGUE E TUMOR PARA EXTRAÇÃO DE DNA VIRAL											
AMOSTRA	IDENTIFICAÇÃO	DATA	PAPILOMA	EXTRAÇÃO DNA TUMOR	EXTRAÇÃO DNA SANGUE	COMP_CASCO	LARG_CASCO	PESO	COND_CORPORAL	PCR Tumor	PCR Sangue
1	T8 VT 136	26/04/13	NÃO	-	SIM	0,626	0,588	30,8	BOA	-	NEGATIVO
2	137	06/05/13	NÃO	-	SIM	0,398	0,36	6,4	BOA	-	NEGATIVO
3	138	06/05/13	NÃO	-	SIM	0,345	0,311	4,1	BOA	-	NEGATIVO
4	144	06/05/13	NÃO	-	SIM	0,487	0,454	14,8	BOA	-	NEGATIVO
5	146	10/05/13	NÃO	-	SIM	0,433	0,352	7,0	BOA	-	NEGATIVO
6	147	10/05/13	NÃO	-	SIM	0,468	0,449	11,6	BOA	-	NEGATIVO
7	148	10/05/13	NÃO	-	SIM	0,354	0,337	5,0	BOA	-	NEGATIVO
8	149	10/05/13	NÃO	-	SIM	0,347	0,319	4,1	BOA	-	NEGATIVO
9	151	10/05/13	NÃO	-	SIM	0,393	0,34	6,2	BOA	-	NEGATIVO
10	152	10/05/13	NÃO	-	SIM	0,490	0,419	13,0	BOA	-	NEGATIVO
11	153	10/05/13	NÃO	-	SIM	0,396	0,360	6,1	BOA	-	NEGATIVO
12	154	10/05/13	NÃO	-	SIM	0,311	0,285	2,8	BOA	-	NEGATIVO
13	155	10/05/13	NÃO	-	SIM	0,426	0,362	7,6	BOA	-	NEGATIVO
14	159	10/05/13	NÃO	-	SIM	0,519	0,460	15,2	BOA	-	NEGATIVO
15	162	10/05/13	NÃO	-	SIM				BOA	-	NEGATIVO
16	J21	17/05/13	NÃO	-	SIM	0,612	0,567	29,4	BOA	-	NEGATIVO
17	J23	17/05/13	NÃO	-	SIM	0,374	0,345	6,03	BOA	-	NEGATIVO
18	J24	17/05/13	NÃO	-	SIM	0,495	0,471	13,9	BOA	-	NEGATIVO
19	T4 VT 131	26/04/13	NÃO	-	SIM	0,593	0,552	23,0	BOA	-	NEGATIVO
20	T1 VT127	26/04/13	NÃO	-	SIM	0,388	0,332	6,0	BOA	-	NEGATIVO
1	T2 VT 129	26/04/13	SIM	SIM	SIM	0,456	0,408	10,0	BOA	POSITIVO	POSITIVO
2	T3 VT 130	26/04/13	SIM	SIM	SIM	0,400	0,353	5,4	BOA	POSITIVO	POSITIVO
3	T5 VT 132	26/04/13	SIM	SIM	SIM	0,477	0,443	11,7	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
4	T6 VT133	26/04/13	SIM	SIM	SIM	0,448	0,396	8,9	BOA	POSITIVO	NEGATIVO

5	T7 VT 135	26/04/13	SIM	SIM	SIM	0,466	0,406	10,9	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
6	139	06/05/13	SIM	SIM	SIM	0,443	0,385	8,7	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
7	140	06/05/13	SIM	SIM	SIM	0,399	0,356	6,6	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
8	141	06/05/13	SIM	SIM	SIM	0,498	0,479	13,7	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
9	142	06/05/13	SIM	SIM	SIM	0,485	0,436	11,7	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
10	143	06/05/13	SIM	SIM	SIM	0,384	0,349	5,6	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
11	150	10/05/13	SIM	SIM	SIM	0,478	0,438	11,2	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
12	156	10/05/13	SIM	SIM	SIM	0,385	0,339	5,6	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
13	157	10/05/13	SIM	SIM	SIM	0,525	0,474	15,4	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
14	158	10/05/13	SIM	SIM	SIM	0,414	0,37	7,3	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
15	160	10/05/13	SIM	SIM	SIM	0,563	0,512	22,2	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
16	161	10/05/13	SIM	SIM	SIM				BOA	POSITIVO	NEGATIVO
17	J20	17/05/13	SIM	SIM	SIM	0,431	0,382	9,5	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
18	J25	17/05/13	SIM	SIM	SIM	0,462	0,407	10,7	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
19	J26	17/05/13	SIM	SIM	SIM	0,425	0,398	9,4	BOA	POSITIVO	NEGATIVO
20	J27	17/05/13	SIM	SIM	SIM	0,370	0,330	5,4	BOA	POSITIVO	NEGATIVO