

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

LUCAS DRUMOND BENTO

**PROTEINOGRAMA SÉRICO DE TARTARUGAS VERDES (CHELONIA MYDAS)
SADIAS E ACOMETIDAS POR FIBROPAPILOMATOSE**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

LUCAS DRUMOND BENTO

**PROTEINOGRAMA SÉRICO DE TARTARUGAS VERDES (CHELONIA MYDAS)
SADIAS E ACOMETIDAS POR FIBROPAPILOMATOSE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Leandro Abreu da Fonseca

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus**

T

B478p
2023

Bento, Lucas Drumond, 1993-
Proteinograma sérico de tartarugas verdes (*Chelonia amyds*)
sadias e acometidas por fibropapilomatose / Lucas Drumond Bento. -
Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (83 f.): il. (algumas color.).
Orientador: Leandro Abreu da Fonseca
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2023.
Referências bibliográficas: .
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.217>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Tartarugas - Doenças; 2. Pele - Exame; 3. Eletroforese; 4.
Proteínas de fase aguda; 5. Inflamação; I. Fonseca, Leandro Abreu da
II. Universidade Federal de Viçosa.. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária III. Título

CDD 22. ed. 639.392

Bibliotecário(a) responsável: ALICE REGINA PINTO PIRES CRB-6/2523


LUCAS DRUMOND BENTO

**PROTEINOGRAMA SÉRICO DE TARTARUGAS VERDES (CHELONIA MYDAS)
SADIAS E ACOMETIDAS POR FIBROPAPILOMATOSE**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 14 de dezembro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **LUCAS DRUMOND BENTO**
Data: 12/07/2024 17:14:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Lucas Drumond Bento
Autor

Documento assinado digitalmente
 **LEANDRO ABREU DA FONSECA**
Data: 15/07/2024 14:55:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Leandro Abreu da Fonseca
Orientador

AGRADECIMENTOS

Sou grato pelo dom da vida e pelas inúmeras experiências que pude vivenciar ao longo dos anos, oportunidades que a mesma me proporcionou. Não somos definidos por um recorte temporal ou um momento específico, mas sim por toda uma trajetória, construída ao longo da vida. Ao final dessa etapa, que é o mestrado, muitos são os motivos de felicidade e de agradecimento. Sou grato pelos momentos vividos e por todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a materialização desse resultado.

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder a força necessária para essa longa jornada e por ter me presenteado com pessoas que caminharam ao meu lado. Aos meus pais, Francisco e Gildete, pelo apoio emocional e muitas vezes financeiro. Ao meu irmão Lemuel pelos bons e agradáveis momentos de descontração, que muito me ajudaram a relaxar e desligar um pouco das obrigações acadêmicas. À minha irmã Leriane por ser sempre o meu braço direito em tudo o que precisei, além de ser minha companheira e confidente em relação às minhas inseguranças e preocupações da vida, àquelas inerentes a esta caminhada acadêmica.

Aos amigos que Viçosa me proporcionou, de todos os setores e laboratórios, em especial aos meus amigos e colegas direto de laboratório, sem dúvida os membros do Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária da UFV se tornaram minha segunda família. Agradeço a todos os professores, técnicos e funcionários que de alguma forma me ensinaram ou contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade. Ao Instituto Marcos Daniel (IMD) em especial ao projeto Chelonia mydas e a todos os membros que me auxiliaram diretamente ou indiretamente nas minhas coletas processamento e análises de dados.

Ao meu amigo e orientador, professor Leandro Abreu da Fonseca, por todo o apoio durante o processo, se fazendo sempre presente mesmo nos momentos de distanciamento físico. Obrigado por ter participado e sonhado esse projeto junto comigo. Agradeço também à banca por ter aceitado o convite para contribuir com o nosso trabalho.

A Universidade Federal de Viçosa pela infraestrutura disponibilizada para que fosse possível a realização do nosso estudo (Laboratório de Pesquisa em Patologia

Clínica Veterinária, Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Núcleo de Análises de Biomoléculas). Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de realização do mestrado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento à pesquisa e concessão da bolsa.

A todos vocês agradeço de coração pois indubitavelmente tornaram a caminhada bem mais leve.

*“Se quer ir rápido, vá sozinho. Se quer ir longe,
vá em grupo”.*

(Proverbio africano)

RESUMO

BENTO, Lucas Drumond, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2023. **Proteinograma sérico de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) sadias e acometidas por fibropapilomatose.** Orientador: Leandro Abreu da Fonseca.

A tartaruga verde é uma entre as cinco espécies de tartarugas marinhas, que ocorrem no litoral brasileiro, sendo categorizada como “ameaçado” dentro da divisão geral de classificação da International Union for the Conservation of Nature – IUCN. Várias são as causas que contribuem para tal classificação. Com o avanço da conscientização os impactos diretos foram mitigados, porém novos desafios surgiram, dentre eles está a fibropapilomatose. O objetivo deste estudo foi identificar e quantificar o proteinograma sérico de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) juvenis, de vida livre, sem a presença visível de fibropapilomas e naturalmente acometidas por fibropapilomatose (FP) por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Os animais foram capturados em dois locais distintos, quais sejam, Santa Cruz (Espírito Santo) e na ilha de Coroa Vermelha (Bahia). Para facilitar o entendimento, as comparações foram estratificadas em 7 etapas, a saber: **Etapa 1 (E1)** – Animais sem FP x animais com FP; **Etapa 2 (E2)** - Animais de CV x animais de SC; **Etapa 3 (E3)** - Animais com FP em CV x animais com FP em SC; **Etapa 4 (E4)** - Animais com FP em CV x animais sem FP em CV; **Etapa 5 (E5)** - Animais com FP em SC x animais sem FP em SC; **Etapa 6 (E6)** - Animais com diferentes graduações de FP: leve x moderado x grave; **Etapa 7 (E7)** - Animais com FP x animais doentes sem FP x animais hígidos. Ao analisar a (E2), foram identificadas diferenças estatísticas significativas em 13 das 16 bandas avaliadas (bandas: 2-12;14;16). Quando comparados os animais com FP de CV com os de SC (E3), observou-se que os animais de SC apresentaram diferenças estatísticas significativas em 5 das 16 bandas (7;9;10;13;14). Já, ao comparar animais dentro do mesmo local geográfico (E4 e E5), constatou-se que, das 16 bandas investigadas, os animais com FP de CV exibiram diferenças estatísticas significativas em 5 bandas (1;3;6;7;11), com médias maiores em todas, quando comparado com os animais também de CV, porém sem FP, tal diferença não foi observada em SC (E5). Ao estratificar os animais de acordo com as distintas graduações de FP (E6), foram

identificadas diferenças estaticamente significativas em 4 das 16 bandas investigadas (5;6;9;16). Os animais foram ainda comparados quanto ao seu status de saúde (E7), revelando diferenças estatisticamente significativas em 6 bandas. Destas, todas apresentaram médias mais altas no subgrupo “animais doentes com FP”, exceto a banda 14 (Ig Kappa), a qual apresentou maior valor de média no subgrupo “não doente”. A partir do estudo realizado foi possível o fracionamento, a quantificação e a caracterização do proteinograma de tartarugas verdes através da técnica proposta. Foram observadas significativas diferenças entre CV e SC, assim como entre os animais com e sem FP. Não houve uma correlação direta de alguma proteína específica caracterizada no estudo com a ocorrência ou ausência da FP, o que não diminui a importância e o potencial promissor das proteínas estudadas como ferramentas complementares para o estadiamento e a monitoração desta e de outras relações ecológicas.

Palavras-chaves: Eletroforese. Proteína de fase aguda. Proteinograma. Inflamação

ABSTRACT

BENTO, Lucas Drumond, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2023.
Serum proteinogram of healthy and affected by fibropapillomatosis green turtles (Chelonia mydas). Advisor: Leandro Abreu da Fonseca.

The green turtle is one of the five species of sea turtles that occur in the Brazilian coast, being categorized as “threatened” within the general classification division of the International Union for the Conservation of Nature – IUCN. Several reasons contribute to this classification. Some direct impacts were alleviated due to the ecological awareness in society. However, new challenges emerged, such as the occurrence of fibropapillomatosis. The objective of this study was to identify and quantify the serum proteinogram of free-living juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) without the visible presence of fibropapillomas and green turtles naturally affected by fibropapillomatosis (FP), using electrophoresis in a polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). The animals were captured in two different locations: Santa Cruz (Espírito Santo) and Coroa Vermelha Island (Bahia). To facilitate understanding, the comparisons were divided in 7 stages, namely: Stage 1 (S1) – Animals without FP x animals with FP; Stage 2 (S2) - CV animals x SC animals; Stage 3 (S3) - Animals with FP in CV x animals with FP in SC; Stage 4 (S4) - Animals with FP in CV x animals without FP in CV; Stage 5 (S5) - Animals with FP in SC x animals without FP in SC; Stage 6 (S6) - Animals with different degrees of FP: mild x moderate x severe; Stage 7 (S7) - Animals with FP x sick animals without FP x healthy animals. When analyzing (S2), significant statistical differences were identified in 13 of the 16 bands evaluated (bands: 2-12;14;16). On S3 comparison, it was observed that SC animals showed statistically significant differences in 5 of the 16 bands (7;9;10;13;14). However, when comparing animals within the same geographic location (S4 and S5), it was found that animals with FP in CV exhibited significant statistical differences in 5 bands (1;3;6;7;11) out of 16 bands investigated with higher averages in all, compared to animals without FP in CV. No significant difference was observed in S5. When classifying the animals according to different FP grades (S6), significant differences were identified in 4 of the 16 bands investigated (5;6;9;16). The animals were also

compared regarding their health status (S7), revealing significant differences in 6 bands. All of them presented higher mean values in the “sick animals with FP” subgroup, except band 14 (Ig Kappa), which presented a higher mean value in the “non-diseased” subgroup. In this study, it was possible to fractionate, quantify, and characterize the proteinogram of green turtles using the proposed technique. Significant differences were observed between CV and SC, as well as between animals with and without FP. There was no direct correlation between any specific protein characterized in the study with the occurrence of FP or not. This finding does not diminish the importance and promising potential of the studied proteins as complementary tools for staging and monitoring the occurrence of FP and other ecological relationships.

Keywords: Electrophoresis. Acute phase protein. Proteinogram. Inflammation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Sistema vertical de eletroforese	45
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média e desvio-padrão (DP) dos valores de eritrograma, leucograma e trombócitos dos animais de CV e SC.....	51
Tabela 2. Concentrações das diferentes bandas proteicas (média \pm DP) obtidas pela eletroforese SDS-PAGE.....	51
Tabela 3. Identificação nominal das bandas através de LC-MS e massa teórica das proteínas.	52
Tabela 4. Etapa 1 - Animais com FP x animais sem FP	53
Tabela 5. Etapa 2 - Animais de CV x SC	53
Tabela 6. Etapa 3 - Animais com FP em CV x animais com FP em SC	54
Tabela 7. Etapa 4 - Animais com FP em CV x animais sem FP em CV	55
Tabela 8. Etapa 5 - Animais com FP em SC x animais sem FP em SC	55
Tabela 9. Etapa 6 - Diferentes graduações de FP: leve x moderado x grave	56
Tabela 10. Etapa 7 - Animais NÃO doentes x doentes SEM FP x doentes COM FP	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	microlitro.
Actin	“Actin-depolymerizing fator”.
Alb	“Serum albumin”
ANOVA	análise de variância
C3	“Complement C3”
CCC	comprimento curvilíneo da carapaça
Cerul	“Ceruloplasmin”
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
ChHV5	“chelonid herpes virus 5”
CV	Coroa Vermelha
Dihydro	“Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial”
DP	desvio padrão
E1	Etapa 1
E2	Etapa 2
E3	Etapa 3
E4	Etapa 4
E5	Etapa 5
E6	Etapa 6
E7	Etapa 7
ECC	escore de condição corporal
FDA	fator de despolarização da actina
FP	fibropapilomatose
FPSSWA	Índice de Fibropapilomatose do Atlântico Sudoeste
GTFP	“green turtle fibropapillomatis”
HAPs	hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HCM	hemoglobina corpuscular média
Ig Kappa	“Ig kappa chain C region”
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
IMD	Instituto Marcos Daniel
IUCN	“International Union for Conservation of Nature”

kDa	kilodalton
LCC	largura curvilínea da carapaça
LC-MS	Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massas
LPPCV	Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária
mg	miligrama
nm	nanômetros
Ovotrans	“Ovotransferrin”
PBS	“phosphate buffered saline”
PFA	proteínas de fase aguda
RBC	“red blood cells”
RFA	resposta de fase aguda
RPM	rotação por minuto
SC	Santa Cruz
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio
SIK3	“Serine/threonine-protein kinase SIK3”
UFV	Universidade Federal de Viçosa
v/v	volume/volume
VCM	volume corpuscular médio
VG	volume globular
ViteloD	“Vitellogenin domain-containing protein”
WBC	“white blood cells”
α 1Anti	“Alpha-1-antiproteinase” (“alfa1 antitripsina”)
α 2M	“Alpha-2-macroglobulin”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. TARTARUGA VERDE (<i>CHELONIA MYDAS</i>).....	19
2.2. FIBROPAPILOMATOSE	24
2.2.1. HISTÓRIA	24
2.2.2. EPIDEMIOLOGIA	25
2.2.3. CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA.....	29
2.2.4. CORRELAÇÃO IMUNOLÓGICA E HEMATOLÓGICA.....	30
2.3. RESPOSTA DE FASE AGUDA.....	32
2.3.1. PROTEÍNAS DE FASE AGUDA.....	33
2.4. PROTEÍNAS SÉRICAS <i>CHELONIA MYDAS</i>	34
2.4.1. PROTEÍNA CONTENDO O DOMÍNIO VITELÓGENINA	34
2.4.2. ALFA-2-MACROGLOBULINA (A2M) E ALFA-1-ANTIPROTEINASE (A1- ANTITRIPSINA) 35	
2.4.3. CERULOPLASMINA.....	36
2.4.4. COMPLEMENTO C3	36
2.4.5. FATOR DE DESPOLARIZAÇÃO DA ACTINA (FDA)/COFILINA	36
2.4.6. OVOTRANSFERRINA	37
2.4.7. ALBUMINA	37
2.4.8. DIIDROOROTATO DESIDROGENASE (QUINONA)	38
2.4.9. IMUNOGLOBULINA CADEIA KAPPA REGIÃO C	38
2.4.10. PROTEÍNA SERINA/TREONINA QUINASE - SIK3.....	38
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. OBJETIVO GERAL	39
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. COMISSÃO DE ÉTICA.....	39
4.2. REGISTRO SISBIO	40
4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	40
4.3.1. LOCAL DE ESTUDO	40
4.3.2. CAPTURA E COLETA DAS AMOSTRAS	41

4.3.3. MORFOMETRIA E AVALIAÇÃO DA SAÚDE DOS ANIMAIS CAPTURADOS	42
4.3.4. ANÁLISES LABORATORIAIS	43
4.3.4.1. ANÁLISES HEMATOLÓGICAS	43
4.3.4.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	44
4.3.4.3. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SÉRICAS	45
4.3.4.4. DIGESTÃO ENZIMÁTICA E DESSALINIZAÇÃO	46
4.3.4.5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS	47
4.3.4.6. ANÁLISE DOS DADOS ORIUNDOS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS	48
4.3.4.7. LOCAL DE EXECUÇÃO DAS ANÁLISES LABORATORIAIS	49
4.3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5. RESULTADOS	50
5.1. MORFOMETRIA E AVALIAÇÃO DA SAÚDE DOS ANIMAIS CAPTURADOS	50
5.2. ANÁLISES HEMATOLÓGICAS	50
5.3. ELETROFORESE E PROTEÔMICA	51
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, as áreas próximas ao litoral têm sido pontos de concentração de seres humanos e de extração de recursos naturais (LOTZE et al., 2006), causando muitos impactos diretos e indiretos no ecossistema marinho. Danos que foram menores nos séculos passados, porém, que aumentaram consideravelmente nos últimos 100 anos (ELLIS, 2011).

Os diversos impactos sobre a saúde da ecologia marinha abrangem uma série de atividades humanas que exercem pressão significativa sobre os ecossistemas marinhos. A exploração excessiva e muitas vezes predatória de peixes e crustáceos, sem considerar períodos de reprodução, representa uma ameaça substancial. A construção de barragens, plataformas petrolíferas, píeres, pontes, portos e dragagens altera o leito marinho, sendo potenciais fatores de perdas de habitat para reprodução, berçário, refúgio e alimentação da vida marinha. Somam-se a esses impactos o descarte inadequado de esgoto em cursos d'águas, com a conseqüente poluição orgânica e inorgânica, contribuindo para a eutrofização e aumentando a frequência e intensidade de florações de algas, a propagação de poluentes químicos, a introdução de espécies não nativas, além das mudanças climáticas (GILLIN; TABOR; AGUIRRE, 2002; HALPERN et al., 2008; LOTZE et al., 2006).

Afora os impactos citados, as tartarugas marinhas sofrem ainda com o trânsito de veículos nas praias, redução da faixa de areia para construções de calçadões, além da ocupação da orla com outras edificações como resorts, hotéis, pousadas e quiosques, com impacto direto pela própria construção em si e indireto pelo aumento do fluxo de pessoas e potencial risco de poluição e degradação destas áreas, as quais muitas vezes são importantes para desova e próximas a sítios de alimentação das tartarugas.

Somadas a estas e tantas outras ameaças encontra-se a fibropapilomatose, que, apesar de ser uma neoplasia benigna, pode ter alta morbidade em tartarugas, principalmente a tartaruga verde (*Chelonia mydas*), podendo causar sérios problemas de natação, flutuação e alimentação no espécime acometido, muitas vezes culminando em sua morte (HERBST, 1994; AGUIRRE; BALAZS, 2000; SWIMMER, 2000; CRAY et al., 2001).

Determinar o estado fisiológico de um indivíduo ou de uma população é um desafio complexo que frequentemente se revela de difícil execução. A avaliação por meio de exames físicos e parâmetros clínicos, embora relevantes, muitas vezes não se mostram precisos o suficiente para atingir tal intento. Nesse contexto, a análise de exames laboratoriais surge como uma ferramenta importante capaz de fornecer informações até então ocultas (CRAY et al., 2001; SANTOS, 2005). A avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos desempenhou um papel pioneiro nessa busca por maior esclarecimento. No entanto, é importante ressaltar que esses dados por vezes não conseguem capturar de maneira abrangente as intrincadas perturbações da homeostase, ou simplesmente tangenciam tais alterações.

Neste contexto, a eletroforese de proteínas séricas pode proporcionar importante papel na elucidação de marcadores precoces de inflamação, como as proteínas de fase aguda. Tal exame presta-se para a avaliação da saúde das tartarugas marinhas, bem como para prever possíveis impactos ambientais nestas, uma vez que a eletroforese permite o fracionamento, identificação e a quantificação das proteínas séricas, viabilizando uma interpretação mais acurada, quando comparada com a separação rotineiramente utilizada, que se vale somente do valor da proteína total e da albumina (GONZÁLEZ. et al., 2017; STOCKHAM; SCOTT, 2008). Portanto, tal técnica pode auxiliar na determinação de um possível diagnóstico, bem como, em alguns casos, pode direcionar um tratamento, o que reflete no prognóstico e qualidade de vida do próprio indivíduo, podendo, ainda, em muitos casos, refletir ou ser útil para a compreensão da qualidade de vida de todo um ecossistema marinho, fundamental para estratégias de manejo e planos de conservação (SÁNCHEZ-SARMIENTO, 2013).

O entendimento e elucidação de marcadores precoces de inflamação como as proteínas de fase aguda em tartaruga verde, podem auxiliar na identificação de animais acometidos por fibropapilomatose em estágios precoces da doença, quando muitas vezes a identificação macroscópica não se faz possível, além de ser uma importante ferramenta para melhor entendimento da fisiopatologia da doença, viabilizando, assim, a mitigação dos impactos causados pela mesma aos animais.

Desta forma, busca-se, através do presente estudo, identificar proteínas inflamatórias de fase aguda e/ou outros biomarcadores no soro de tartarugas verdes

(*Chelonia mydas*), bem como estabelecer valores fisiológicos e valores para animais acometidos por fibropapilomatose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Existem distribuídas no mundo 7 (sete) espécies de tartarugas marinhas, das quais 5 (cinco) ocorrem na costa brasileira e/ou nas ilhas que pertencem ao território nacional. São elas: *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761) (tartaruga-gigante ou de couro), *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) (tartaruga-de-pente), *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) (tartaruga-oliva), *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) (tartaruga-cabeçuda) e *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (aruanã ou tartaruga-verde). Todas as cinco espécies de ocorrência em território brasileiro são categorizadas pela International Union for Conservation of Nature – IUCN como “ameaçado” dentro da divisão geral de classificação (BINDACO, 2020).

Estes répteis, principalmente no momento da postura, tornam-se muito vulneráveis, sendo historicamente caçados há centenas de anos por sua carne, óleo, carapaça, pele e ovos. A captura exacerbada e predatória resultou no colapso e extinção de várias colônias, principalmente nas continentais (MÁRQUEZ, 1990). Com o avanço da conscientização e trabalhos de conservação, a caça às tartarugas, em um cenário mundial, reduziu drasticamente nos últimos séculos, movimento também observado a nível nacional, este alavancado principalmente por ações do Projeto Tartaruga Marinha - TAMAR.

Atualmente, consoante discutido durante a introdução, as ameaças às populações de tartarugas marinhas mudaram, porém continuam potencialmente danosas, e apesar das ações antrópicas diretas serem responsáveis por alto índice de mortalidade de tartarugas (GAGLIARDI; LOPES; SERAFINI, 2018), outras causas, muitas vezes relacionadas indiretamente com as ações antrópicas, como doenças virais, parasitárias e bacterianas, também representam importantes causas de mortes de tartarugas marinhas (DOMICIANO et al., 2017; GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990).

2.1. Tartaruga verde (*Chelonia mydas*)

A tartaruga verde ou tartaruga aruanã (*Chelonia mydas*) é uma espécie de tartaruga marinha, pertencente à ordem Testudinata e a família Cheloniidae com ampla distribuição pelo globo, sendo encontrada principalmente entre 40°N e 40°S de latitude, concentrando-se nas regiões tropicais e subtropicais dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico. Sua presença ocorre em zonas costeiras de mais de 140 países e nidificam em mais de 80 destes (HIRTH, 1997).

Esta espécie ocupa várias áreas importantes de alimentação na Nicarágua (CARR; CARR; MEYLAN, 1978), Flórida (SCHMID, 1998), Porto Rico (COLLAZO; BOULON; TALLEVAST, 1992), Havaí (BALAZS et al., 1993), Texas (SHAVER, 1994) e outras áreas de reprodução como a Ilha de Ascensão, no Atlântico (MORTIMER; CARR, 1987 *apud* HIRTH, 1997), Tortuguero, Costa Rica (OGREN, 1989 *apud* HIRTH, 1997) Indonésia (GROOMBRIDGE; LUXMOORE, 1989 *apud* HIRTH, 1997) e Ilha de Galápagos (GREEN, 1993 *apud* HIRTH, 1997).

No Brasil, exemplares adultos e juvenis podem ser encontrados ao longo de toda costa (BAPTISTOTTE, 2007), representando a espécie de tartaruga marinha mais encontrada no país. Todavia, apesar de utilizar toda a costa brasileira para alimentação, apenas alguns pontos são utilizados para desova, sendo estes principalmente insulares.

As tartarugas verdes possuem ciclo de vida complexo, e apesar de serem marinhas, são dependentes do ambiente terrestre (praia) para sua reprodução, a qual, como na maior parte dos répteis, apresentam variações reprodutivas sazonais, sendo tal padrão estabelecido por hormônios esteroides (OWENS, 1997; HAMANN et al., 2002). No Brasil, o período compreende os meses mais quentes do ano, com pico de desova ocorrendo nos meses de janeiro e fevereiro. Estudos de DNA mitocondrial de tartarugas marinhas comprovaram a, até então, hipótese de que as fêmeas retornavam para a mesma região onde nasceram para nidificar (BOWEN et al., 1992; FITZSIMMONS et al., 1997), o que reforça a importância da conservação de todos os locais de desova, visto que uma vez extinta uma população em uma determinada região, dificilmente esta área será repovoada naturalmente novamente.

No Brasil, as maiores colônias reprodutivas de tartaruga verde são encontradas nas ilhas oceânicas de Trindade-ES (MOREIRA et al., 1995; MOREIRA, 2003),

seguida pelo Atol das Rocas-RN e Arquipélago de Fernando de Noronha-PE (BELLINI; SANCHES, 1996). Existem em menores números áreas continentais de desova de tartaruga verde, as quais podem ser encontradas em alguns pontos no litoral dos estados do Rio Grande do Norte, Bahia, Sergipe e Espírito Santo (MARCOVALDI; LAURENT, 1996; MARCOVALDI; MARCOVALDI, 1999).

As tartarugas-verdes, à semelhança de outras tartarugas-marinhas, durante a fase reprodutiva migram das zonas de alimentação para as áreas de nidificação. A reprodução não é anual, podendo ocorrer intervalos entre dois e três anos (MILLER, 1997). Durante a temporada de reprodução, uma fêmea pode realizar várias posturas espaçadas, com aproximadamente duas semanas entre elas, período conhecido como internidal (PRANGE; JACKSON, 1976; MILLER, 1997).

Alguns autores apontam que o intervalo entre as posturas é estratégico do ponto de vista reprodutivo, uma vez que os ovos são depositados em ninhos distintos em tempos diferentes, reduzindo as chances de predação e/ou qualquer outra intercorrência que poderia comprometer toda a temporada reprodutiva, além do fato de ser fisiologicamente inviável para a fêmea carregar em seu oviduto todos os ovos de uma temporada ao mesmo tempo, bem como fazer um ninho grande o suficiente que comportasse todos eles (CARR; HIRTH, 1960). A cada postura uma fêmea de tartaruga verde deposita em média 100 a 125 ovos (BINDACO, 2020).

A cópula ocorre geralmente em áreas próximas à costa onde sucederá a postura (MUSICK; LIMPUS, 1997). Outros autores defendem que o acasalamento ocorra em alto mar, quando então a fêmea se deslocará para a praia do seu nascimento para a ovoposição (BINDACO, 2020). Entre as posturas as fêmeas tornam-se residentes próximas às praias de desova, permanecendo na região até o fim da sua temporada reprodutiva (MORTIMER; PORTIER, 1989).

A desova, bem como o nascimento dos filhotes, ocorre geralmente no período noturno, buscando-se o anonimato e a proteção pela ausência da luz solar, a fim de se mitigar predação, além de se evitar uma possível queimadura pela incidência direta de raios solares e desidratação, tanto da fêmea, durante a desova, quanto dos filhotes, durante o nascimento. Uma vez depositados os ovos, estes são incubados naturalmente pela temperatura ambiente, por aproximadamente 50 a 60 dias. A temperatura de incubação possui influência direta para a eclosão, bem como é decisiva para a determinação do sexo dos filhotes. Uma temperatura que gera 50%

de eclosão de fêmeas e 50% de eclosão de machos é denominada de temperatura pivotal, que para *Chelonia mydas* é em torno dos 29°C. Acima dessa temperatura, maior será a porcentagem de fêmeas e abaixo desta, maior será a porcentagem de machos, podendo chegar a 100% de nascimentos de um único sexo, isso em temperaturas próximas a 33°C e 24°C, respectivamente (MROSOVSKY, 1994; WIBBELS, 2003).

A duração da incubação e o sucesso de eclosão podem variar de acordo com características das fêmeas e com características das praias de nidificação (MILLER, 1997), sendo que geralmente a porcentagem de eclosão para tartaruga verde é de 75% a 90% (CAMILLO et al., 2009). O sucesso de eclosão pode ser afetado por inúmeros fatores, inclusive antrópicos, tais como: compactação dos ninhos por pisoteio intenso, trânsito de veículos, presença de substâncias tóxicas na areia, dentre outros. Fatores antrópicos podem reduzir significativamente a taxa de nascimentos (LUTCAVAGE et al., 1997).

Condições adequadas de temperatura, umidade, salinidade e trocas gasosas, são imperativas para o sucesso na incubação dos ovos e geração de filhotes saudáveis ao nascimento (SANTOS et al., 2011a). Em locais onde o ninho esteja sob ameaça, antrópica ou não antrópica, estratégias de conservação, como transferência dos ovos para cercados de incubação ou locais mais seguros na própria praia, são por vezes utilizadas, porém estas devem ocorrer tão somente quando a permanência do ninho *in situ* seja inviável, uma vez que a manipulação dos ovos por si só diminui sua taxa de eclosão (ACKERMAN, 1997).

Após o nascimento, os filhotes (pesando em média 25g) vão em direção ao mar. A fase de filhote é a mais curta, sendo compreendida do nascimento até aproximadamente uma semana de vida. A partir de então, são classificados como juvenis, período que se estende até que os animais apresentem comprimento curvilíneo de carapaça (CCC) de 40 cm. A maturidade sexual em indivíduos de vida livre geralmente é mais tardia, quando comparada com animais de cativeiro, ocorrendo entre 26 e 46 anos, período em que os animais alcançam a vida adulta e possuem um CCC em torno de 70 a 100 cm (HIRTH, 1997; SANTOS et al., 2011b). É ainda relatada uma fase em que os animais são classificados como subadulto, período no qual ainda não houve a maturidade sexual, porém, os animais possuem um CCC

maior que 40 cm, não se enquadrando, portanto, nos parâmetros para classificação de juvenis (BINDACO, 2020).

Durante as diversas fases compreendidas dentro do ciclo biológico das tartarugas verdes, diferentes áreas são ocupadas. Carr (1987) observou que os filhotes ao entrarem no mar, podem inicialmente nadar por várias horas até alcançarem correntes marítimas que os levam para regiões em alto mar, associando-se a aglomerados flutuantes de algas, principalmente do gênero *Sargassum*, podendo permanecer ali por longos períodos. Essa associação proporciona proteção e menor risco de predação, além de auxiliar em seu transporte passivo pelo oceano até desenvolverem a capacidade plena para a natação (MUSIC; LIMPUS, 1997).

Ao longo da fase juvenil, a alimentação das tartarugas verdes é pouco conhecida. Alguns estudos revelaram que durante a fase oceânica (pelágico), estes animais possuem um hábito onívoro com tendência a carnívoro, pela grande participação de itens animais na sua dieta, a qual é composta por águas-vivas, salpas e outros invertebrados (WITHERINGTON; HIRAMA; HARDY, 2012). Após a fase oceânica, quando estes animais vão para a zona nerítica, com aproximadamente 30 a 40 cm de CCC (BRILL et al., 1995), as tartarugas verdes passam a ter um hábito alimentar predominantemente herbívoro, composta principalmente por gramíneas e algas marinhas, hábito que é único entre as tartarugas marinhas (BJORNDAL, 1997) e que permanece durante o restante de suas vidas.

A tartaruga verde é um animal tipicamente nectônico e na maior parte da vida solitário, podendo ocasionalmente, em áreas de alimentação, formar agregados com animais provenientes de origens diversas (MÁRQUEZ, 1990). A forma como os animais interagem entre si e com seu habitat é influenciada pela ecologia alimentar.

Entender como se dá essa relação é imperativo para a conservação dos animais, visto que a alimentação é um dos pilares para a sobrevivência, crescimento e reprodução de uma espécie (BJORNDAL, 1985; BRILL et al., 1995). Portanto, a ecologia alimentar de uma espécie pode e certamente vai variar ao longo de sua distribuição. Tal fato ocorre por vários fatores, entre eles destaca-se a abundância, distribuição e qualidade dos alimentos, bem como a temperatura da água, sazonalidade, estágio fisiológico, preferências individuais, entre outros (CARR, 1987; RICKLEFS, 1987; WHELAN; SCHMIDT, 2007).

As espécies de tartarugas marinhas podem ser diferenciadas entre si morfologicamente através da observação das características externas específicas de cada espécie. Dentre elas, as usualmente utilizadas são: tamanho, formato e número de escudos laterais da carapaça, número de placas localizadas na cabeça, coloração da pele e carapaça (WYNEKEN, 2001). A tartaruga verde é caracterizada por possuir quatro pares de placas laterais de coloração marrom claro com estrias radiais esverdeadas quando adultas, com tendência a coloração marrom quando jovens, e o plastrão variando do branco ao branco/amarelado. A cabeça é pequena e com presença de um único par de escamas pré-frontal (BAPTISTOTTE, 2007).

No Brasil, as tartarugas verdes adultas apresentam um CCC médio de 115,6 cm, podendo chegar a 144 cm de CCC (MOREIRA, 2003), com média de 134kg para os machos e 147kg para as fêmeas (MENDONÇA et al., 2007). Exemplares encontrados no Atlântico e no Pacífico oriental podem atingir em torno de 230kg (PRITCHARD; MORTIMER, 1999; BAPTISTOTTE, 2007).

A tartaruga verde é a espécie com maior população no território brasileiro e possui um ciclo de vida longo e complexo. O fato destes animais atingirem a maturidade sexual tardiamente, quando comparada com as demais espécies de tartarugas marinhas, faz com que se aumente a probabilidade de alguns indivíduos morrerem antes de estarem aptos a reprodução e conseqüentemente contribuir para a manutenção da espécie (HEPPEL et al., 2003).

Tal razão dificulta também a determinação do seu status de conservação em tempo real, visto que uma das formas é a utilização do número de ninhos por temporada reprodutiva, o que causa um grande lapso temporal entre as gerações, tornando o diagnóstico tardio. Uma redução no número de filhotes ou juvenis só será percebida vários anos depois, quando estes ingressarem na fase reprodutiva e as fêmeas retornarem para a desova na praia de seu nascimento.

Diversos fatores contribuem para o declínio populacional destes animais na costa brasileira. Como já citado, um dos principais são as ações antrópicas que geram a perda de áreas de desova e alimentação, causam mortalidade (principalmente por apetrechos de pesca ou por pesca direta), além do lançamento de resíduos não biodegradáveis e poluentes aos oceanos (SANTOS, 2011). Somados a estes, se encontram as ameaças de caráter inflamatório e/ou infeccioso causados por agentes virais, bacterianos, fúngicos e parasitários (BAPTISTOTTE, 2014; DOMICIANO et al.,

2017). Dentre estas doenças, se destaca a fibropapilomatose, a qual, apesar de já ter sido diagnosticada em tartaruga-de-pente *Eretmochelys imbricata* (D'AMATTO, A.F. & MORAES-NETO, 2000), tartaruga-oliva *Lepidochelys olivacea* (AGUIRRE et al., 1999), tartaruga-cabeçuda, *Caretta caretta* (HERBST, 1994a), tartaruga-gigante *Dermochelys coriacea* (HUERTA et al., 2002), tartaruga-marinha-australiana *Natator depressus* (LIMPUS; MILLER, 1994), tartaruga-de-Kemp *Lepidochelys kempi* (HARSHBARGER, 1991), representa uma importante ameaça principalmente à população de tartarugas verdes (WORK; BALAZS, 1999). Esta ameaça se torna ainda maior visto que tem um alcance global, acometendo tartarugas marinhas em várias partes do mundo (HERBST, 1994a).

2.2. Fibropapilomatose

2.2.1. História

A doença foi primeiramente relatada no ano de 1938 no aquário de Nova York, em um exemplar de tartaruga verde (*Chelonia mydas*) oriundo de Key West, Flórida - EUA, dois anos antes da manifestação dos tumores, sendo, na ocasião, caracterizado como um crescimento fibroepitelial (SMITH; COATES, 1938).

No mesmo ano, foram relatadas outras duas ocorrências de fibropapilomatose no estado da Flórida – EUA, Smith e Coates (1938), em três indivíduos de um total de 200 em um estudo com animais de vida livre. Lucké (1938, *apud* HERBST, 1994a) descreveu tumores similares em uma tartaruga verde capturada ao largo de Cape Sable – EUA.

Em 1948, houve os primeiros registros de fibromas viscerais associados à fibropapilomatose, identificados nos pulmões de tartarugas verdes (SCHLUMBERGER; LUCKÉ, 1948). No ano de 1958, a fibropapilomatose foi identificada na Malásia em fêmeas durante a desova (HENDRICKSON, 1958) e ocorreu o primeiro relato no Havaí (BALAZS; POOLEY, 1991).

O primeiro caso confirmado de fibropapiloma no Havaí ocorreu no ano de 1958 por (HERBST, 1994a). Desde este primeiro relato, houve um aumento crescente na prevalência, alcançando quantitativo superiores a 80% (BALAZS; POOLEY, 1991).

No ano de 1980 houve um surto de fibropapilomatose em um grupo de fêmeas que compunham o plantel da fazenda de tartarugas Cayman, Ltd, Grand Cayman (JACOBSON et al., 1989). A partir de 1986 a notificação de fibropapilomatose se tornou constante na costa leste da Flórida. De acordo com Foley et al. (2005) ocorrências de fibropapilomatose na costa oriental dos Estados Unidos em tartarugas encalhadas passou de aproximadamente 10% para 30% entre o início dos anos 1980 ao final de 1990.

Até então, a fibropapilomatose só havia sido diagnosticada em tartarugas verdes, ocorrendo preponderantemente em juvenis a partir de 45 cm de CCC e em adultas; foi quando Work & Balazs (1999) aduziram comentários de outros pesquisadores sobre a ocorrência de FP em *Lepidochelys olivacea* no pacífico leste.

No Brasil, o primeiro registro de fibropapilomatose foi observado em 1986 no estado do Espírito Santo e desde então, as ocorrências têm sido frequentemente registradas (BAPTISTOTTE et al., 2001). Por ser a doença que acomete tartarugas marinhas com maior relevância, a partir do ano de 2000 foi inserido no banco de dados nacional do Projeto TAMAR um campo específico para relatar a presença ou não de tumores, a fim de auxiliar na monitoração e informação do estado e da ocorrência da doença no Brasil (BAPTISTOTTE, 2007).

2.2.2. Epidemiologia

A “green turtle fibropapillomatis” (GTFP) ou somente fibropapilomatose (FP) é uma neoplasia crônica debilitante, sendo considerada a mais expressiva neoplasia em répteis (HERBST, 1994b). Apresenta ocorrência global e ameaça as populações de tartarugas marinhas com maior ocorrência em regiões com alto grau de antropização, áreas costeiras mais insalubres, e de baixo hidrodinamismo. Apesar desta recorrente associação entre a ocorrência da doença e as características antrópicas do meio, estas relações ainda são pouco compreendidas (SANTOS et al., 2015).

Os fatores predisponentes da fibropapilomatose ainda não foram totalmente elucidados, porém, existem várias hipóteses. Alguns autores buscaram correlacionar a fibropapilomatose com a poluição, porém, não encontraram associações diretas entre esta e a ocorrência de fibropapilomatose. Keller et al., (2014) excluíram a

possibilidade de relação entre pesticidas e outros poluentes orgânicos como causas para desenvolvimento da doença.

Santos et al. (2015) em um estudo comparando níveis de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), formados a partir de fontes de óleos naturais e principalmente derivados da extração de petróleo, em tartarugas verdes oriundas de diferentes áreas com distintas classificações de conservação, não observaram um aumento crescente, como previamente hipotetizado pelo autores, nos valores de HAPs das tartarugas em ambientes com baixo impacto antrópico quando comparado com os animais que viviam em ambiente como alto impacto. Porém, os autores demonstraram que 100% das tartarugas que apresentavam fibropapilomatose apresentaram níveis detectáveis de HAP, com resultados mais elevados nos animais mais afetados e debilitados (SANTOS et al., 2015), possivelmente pelo comprometimento orgânico destes animais, uma vez que os HAPs são compostos metabolizados e excretados facilmente pelo sistema hepático e renal em animais saudáveis (GRAY, 2002).

Nos anos 90 surgiram importantes informações para o entendimento da etiologia da fibropapilomatose. Nesta década, a participação de um vírus, que até então era apenas uma suposição, foi elucidada e se conseguiu promover a infecção experimental em *Chelonia mydas* através da injeção de um extrato oriundo de tumores. Foi quando a então suspeita de se tratar de uma doença infecciosa com a participação de um novo herpesvirus foi confirmada (HERBST et al., 1995a, 1999; HERBST; KLEIN, 1995).

Os estudos sobre transmissão da FP continuaram, e, em 1995, Herbst et al., conseguiram a indução da fibropapilomatose através da inoculação por escarificação ou injeção de um filtrado subcelular de extrato de tumor em tartarugas juvenis criadas desde neonatas em cativeiro. Com isso, foi demonstrado que a fibropapilomatose era causada por um agente infeccioso sub-celular e que o agente etiológico era possivelmente um “herpesvirus-like”, identificado por microscopia eletrônica (HERBST et al., 1995b).

Com a evolução e difusão de técnicas moleculares foi possível detectar por PCR que se tratava de um novo membro da família *Orthoherpesviridae* – *Scutavirus chelonidalfa5*, anteriormente classificado como *Chelonid herpesvirus 5* (ChHV5), que pertencia a então família *herpesviridae* (ICTV, 2022), cuja sequência de DNA variava

entre diferentes regiões e entre espécies de tartarugas acometidas (QUACKENBUSH et al., 1998). 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).

Foi também através da utilização da PCR que o DNA viral foi encontrado nos tumores e em diversos tecidos de tartarugas com fibropapilomatose, não sendo detectados em tartarugas sadias (LU et al., 2000).

Trabalhos sobre a etiologia continuaram sendo realizados, e os achados sobre a relação da FP com herpesvirus foram reincidentes, evidenciando uma forte correlação de achados de DNA herpesviral em tumores e em tecidos de tartarugas acometidas. Porém, as tentativas de cultivar o vírus, mesmo em células de tartarugas, não obtiveram sucesso (KLEIN et al., 1998; LACKOVICH et al., 1999) e com isso, o cumprimento do postulado de Koch permanece incompleto, apesar das várias evidências (SANTOS et al., 2015).

A partir de análises moleculares do herpesvirus associado à fibropapilomatose de tartarugas da Flórida, foram encontradas 5 variantes, sendo 3 bem semelhantes (FL-A, FL-B, FL-C), uma com 5,6 % de divergência (FL-D) em *C. caretta* da Flórida e outra variante do Havaí (HA) com 2,2 % de divergência das FL-A, B e C. A variante FL-A foi encontrada em *C. mydas* e *C. caretta* e a variante C em *C. caretta* e *L. kempii*, demonstrando haver uma troca de variantes entre espécies simpátricas. Posteriormente foram detectadas 6 (seis) variantes virais no Brasil pertencentes ao grupo Atlântico (Porto Rico, Golfo da Guiné), Atlântico oeste e Caribe leste (RODENBUSCH et al., 2012). A ocorrência destas variantes combina com a dos haplótipos de DNA mitocondrial e nuclear de *Chelonia mydas* juvenis encontrados no Brasil (SANTOS et al., 2015).

Sob a hipótese de que os herpesvírus co-evoluem com seus hospedeiros, os autores estimaram que as variantes virais se formaram entre 1,6 a 4 milhões de anos, concluindo portanto que a FP não surgiu devido a uma mutação recente no vírus, pois seria muito improvável que ocorresse em todas as variantes ao mesmo tempo (SANTOS et al., 2015).

Apesar dos recorrentes trabalhos que apontam o herpesvírus como agente causal da fibropapilomatose, isto somente não explicaria as características ecológicas

já conhecidas da doença, como por exemplo, afetar principalmente juvenis, ocorrer em áreas costeiras mais poluídas e a grande variação na prevalência em áreas geográficas próximas (HERBST, 1994b), além da possibilidade de regressão observada em alguns animais (BENNETT; KEUPER-BENNETT; BALAZS, 1999).

Estas características epidemiológicas somadas às evidências filogenéticas citadas anteriormente, como a preexistência do vírus antes do início do surto, apontam para o fato de a presença viral ser determinante, porém, não exclusiva para o surgimento da fibropapilomatose. Adicionalmente ao vírus, verifica-se a possibilidade dos fatores ambientais contribuírem para o surgimento da doença e para sua evolução rápida e pandêmica (SANTOS et al., 2015).

Apesar da descoberta do envolvimento viral no desenvolvimento da doença ainda se carece de estudos sobre a forma de disseminação no ambiente natural (WORK et al., 2015). Nos primórdios dos estudos de como se dava a disseminação da fibropapilomatose, surgiu uma hipótese que propôs a participação de algum hospedeiro intermediário ou vetor mecânico. O peixe limpador *Talassoma duperrey* foi apontado como potencial vetor mecânico do vírus e as sanguessugas do gênero *Ozobranchus spp.* poderiam atuar como hospedeiras intermediárias, porém fazer esse tipo de associação apenas por isolar o vírus no organismo candidato pode não ser adequado, pois o isolamento não implica necessariamente na transmissão, além do fato das sanguessugas deste gênero completarem seus ciclos biológicos em um único hospedeiro, mitigando suas possibilidades de atuarem como importantes disseminadores do vírus apontado como causador da fibropapilomatose (SANTOS et al., 2015).

A transmissão vertical ainda carece de estudos com números amostrais mais robustos, porém, em um estudo realizado verificou-se que havia uma fêmea acometida por fibropapilomatose, contudo os filhotes foram negativos (ALFARO-NÚÑEZ et al., 2014). Há ainda a possibilidade da ocorrência de transmissão direta via água, visto que o vírus pode permanecer viável por até 5 dias na água, a depender das condições ambientais (CURRY et al., 2000).

Muito embora não seja o gatilho principal para a ocorrência da doença, fatores ambientais tais como a poluição, podem contribuir para o seu desenvolvimento e são condicionantes para o grau de acometimento dos animais, visto que 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 partir da identificação do ChHV5, os fatores ambientais passaram a ser considerados como indutores ou moduladores da infecção e de sua manifestação e não mais como agentes causais (SANTOS et al., 2015), podendo estes favorecer o vírus (VAN HOUTAN et al., 2014) ou prejudicar o hospedeiro através do comprometimento da imunidade (WORK et al., 2001).

Mesmo existindo uma evidência convincente de uma etiologia viral, outros fatores como parasitos, suscetibilidade genética, carcinógenos químicos, contaminantes ambientais, biotoxinas, imunossupressão e luz ultravioleta podem desempenhar um importante papel adicional na etiologia da fibropapilomatose, bem como na sua severidade de apresentação (AGUIRRE et al., 1998; SANTOS et al., 2015).

Com a confirmação da associação da fibropapilomatose com um agente viral, a busca para a caracterização do vírus envolvido se intensificou. Atualmente o vírus é classificado como pertencente da família *Orthoherpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Scutavirus* e espécie *Scutavirus chelonidalpha5* anteriormente denominado de *Chelonid herpes virus 5* (ChHV5) (ICTV, 2022).

2.2.3. Caracterização macro e microscópica

Existem grandes variações quanto ao número, tamanho e área corpórea acometida pelos fibropapilomas, variando consideravelmente de um animal para outro, bem como de diferentes regiões geográficas, possivelmente influenciadas pela variante viral envolvida (HERBST et al., 2004; ROSSI et al., 2016).

Sua apresentação ocorre por massas tumorais simples ou múltiplas que variam entre 0,1 e 30 cm de diâmetro, de aspecto verrucoso ou liso, sésseis ou pedunculados, com coloração variando de esbranquiçada a enegrecida, sendo geralmente cruentos quando traumatizados (THOMSON, 1983; PETERSON; COUTO, 1998). Os nódulos normalmente se localizam nas nadadeiras, pescoço, cabeça, tecido periocular, cavidade bucal, região inguinal e pericloacal (HERBST, 1994a; MATUSHIMA, 2003).

Os animais com grandes quantidades de tumores cutâneos tendem a desenvolver formas viscerais associadas às apresentações neoplásicas cutâneas

(SCHUMACHER,1996). Esses tumores são caracterizados como fibromas, fibrosarcomas de baixo grau de malignidade e mixofibromas (NORTON; JACOBSON; SUNDBERG, 1990; WORK et al., 1998).

Microscopicamente a fibropapilomatose é caracterizada histologicamente por uma proliferação estromal hiperplásica e proliferação epidermal. As células epiteliais apresentam severo pleomorfismo nuclear, presença de vacuolização citoplasmática, degeneração das células da epiderme e proliferação de fibroblastos (SCHUMACHER, 1996; MATUSHIMA, 2003).

De acordo com Schumacher (1996), a presença de inclusões intracelulares eosinofílicas em células epidermais é um achado bastante frequente, tanto na microscopia óptica quanto na eletrônica. Brito et al., (2014) relataram a ocorrência de metaplasia epitelial, com proliferação de tecido conectivo denso, além de processo inflamatório purulento associado a fibropapilomas múltiplos (BRITO et al., 2014; KNÖBL; REICHE; MENÃO, 2011).

2.2.4. Correlação imunológica e hematológica

O aumento da severidade da doença está associado com a deterioração das condições fisiológicas. O animal não necessita estar imunocomprometido para adquirir a FP, mas uma vez doentes, tornam-se mais susceptíveis a outras doenças (WORK; BALAZS, 1999; WORK et al., 2001), ocasionando uma resposta de fase aguda e um quadro de estresse crônico com conseqüente indução da elevação dos níveis plasmáticos de cortisol levando a uma imunossupressão (AGUIRRE et al., 1998). Cray et al., (2001) concluíram que a fibropapilomatose possui efeito na imunidade, visto que as tartarugas acometidas tinham diminuição da resposta linfocitária a mitógenos.

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 (FONSECA, 2014). Segundo um trabalho realizado por Santos (2005), não existem diferenças significativas entre os valores bioquímicos e de hematócrito de tartarugas verdes juvenis selvagens submetidas ao estresse em decorrência da fibropapilomatose. Entretanto, em um estudo no qual se investigou a relação da fibropapilomatose e dos parâmetros hematológicos de tartarugas verdes demonstrou-se que os animais mais

acometidos apresentavam valores maiores para leucócitos totais, por heterofilia e monocitose, e redução dos demais parâmetros hematológicos (WORK; BALAZS, 1999). Tais diferenças podem ser decorrentes de vários fatores, inclusive do grau de acometimento pela fibropapilomatose nestes animais.

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 (CRAY et al., 2001; MATUSHIMA, 2003), o que já havia sido apontado por Aguirre et al. (1995) que, ao analisarem um grupo de tartarugas verdes com e sem fibropapilomatose, obtiveram maior contagem de heterofilos e maior relação heterófilo:linfócito no grupo com fibropapilomatose.

O cortisol, quando elevado por situações de estresse, induz a um incremento de leve a moderado no número de heterófilos circulantes, situação denominada de heterofilia. Esta se dá por duas formas principais, quais sejam, aumento na produção/liberação de heterofilos da medula óssea, e perda de estímulo para a aderência e diapedese destes heterófilos da circulação para o sítio de ação (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 na sua liberação pela medula óssea em função da interferência da ação quimiotática da histamina nos eosinófilos. Especula-se que a redução dos valores de basófilo ocorra pela mesma causa da eosinopenia, porém a interpretação do achado de diminuição nos valores globais de basófilo é de difícil interpretação e de pouca valia, visto que os valores fisiológicos basais destas células são muito baixos (0,0 - 45,3 células/ μ L) (SANTOS et al., 2009). O mecanismo da monocitose permanece desconhecido (JAIN, 1993).

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 relação de cálcio e fósforo (AGUIRRE et al., 1998; MATUSHIMA, 2003). Pode ocorrer imunossupressão, acompanhada de infecções bacterianas secundárias e redução dos níveis de colesterol e triglicérides (WORK et al., 2003).

Santos, (2005) buscava em seu trabalho achar uma assinatura bioquímica que pudesse caracterizar a fibropapilomatose, ajudando em seu diagnóstico e prognóstico, porém chegou à conclusão de que os parâmetros bioquímicos apenas indicavam um estado de condição geral do animal e não uma característica específica da fibropapilomatose.

2.3. Resposta de fase aguda

A resposta de fase aguda (RFA) é uma reação inflamatória sistêmica que está compreendida dentro do sistema imune inato, caracterizada por ser inespecífica e generalista, presente nos humanos e animais como resposta frente a mudanças em sua homeostase (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005a).

A imunidade inata é composta por uma série de mecanismos rápidos de defesas celulares e bioquímicos mesmo antes da consolidação do processo inflamatório e/ou infeccioso. Os principais componentes da imunidade inata são: (1) barreiras físicas e químicas, tais como epitélio e agentes antimicrobianos produzidos nas superfícies epiteliais; (2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas, células “natural killer” (NK) e outras células linfoides; e (3) proteínas sanguíneas, incluindo membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação (ABBAS et al., 2015).

A RFA pode ser considerada um dos marcadores mais precoces para o diagnóstico, acompanhamento e prognóstico dos processos patológicos ou doenças (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005a). A RFA é caracterizada por alterações rápidas do organismo mediadas por polipeptídeos. Esta resposta é produzida como consequência do reconhecimento de estímulos nocivos de diversas origens conhecidos como Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) e Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) (SCHRÖDL et al., 2016).

Em resposta a estes estímulos, citocinas pró inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) são liberadas pelos macrófagos e monócitos que estão presentes no local de inflamação. As citocinas ligam-se a receptores em células alvo e produzem reações sistêmicas que envolvem diversos mecanismos, produzindo sinais clínicos, alterações laboratoriais e fisiológicas tais como febre, leucocitose, variações hormonais, ativação do

complemento e modificações na concentração das proteínas plasmáticas (GRUYS et al., 2005; ECKERSALL, 2008; CRAY; ZAIAS; ALTMAN, 2009). Alguns destes importantes marcadores, que ainda são válidos na medicina moderna atualmente, já eram utilizados ou avaliados em pacientes doentes há muito tempo pela humanidade.

Outros importantes biomarcadores como as proteínas séricas foram subutilizadas, principalmente por serem categorizadas historicamente em dois grandes grupos, a saber, albumina e as globulinas. Tal divisão atrasou e limitou sua utilização como biomarcador de lesão, processo patológico e/ou doença. Fato que perdurou até aproximadamente os anos 1930, com a identificação da Proteína C reativa e do reconhecimento de seu importante valor na medicina humana, principalmente na medicina cardiovascular.

2.3.1. Proteínas de fase aguda

As proteínas de fase aguda (PFAs) são biomarcadores precoces e sensíveis de processos inflamatórios, alterando, geralmente, suas concentrações séricas antes da visualização de um quadro de leucocitose, por exemplo (CALDIN et al., 2009).

Porém, são marcadores inespecíficos de inflamação (CRAY; BELGRAVE, 2014). (ECKERSALL; BELL, 2010), relatam que essas proteínas podem alterar suas concentrações em mais de 25% em resposta à estimulação de citocinas pró-inflamatórias em processos de doença. Suas concentrações séricas são proporcionais à severidade e ao dano dos tecidos afetados (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004), bem como estão relacionadas com a espécie animal envolvida. Todos os animais possuem PFAs, entretanto com importâncias diferentes nas expressões destas para diferentes tipos de lesões ou estímulos (ECKERSALL; BELL, 2010).

Tal resposta ocorre basicamente com o objetivo de evitar distúrbios imunológicos, crescimentos neoplásicos, crescimento bacteriano, viral e/ou parasitário, reestabelecer a homeostase e manter o estado de saúde do indivíduo frente a lesões de diferentes origens. Apesar do nome, suas aplicações não se limitam a processos agudos. Em casos de estimulação persistente, infecção ou inflamações crônicas, concentrações de PFAs permanecem alteradas quando comparadas aos animais saudáveis (GRUYS et al., 2005).

As PFAs são sintetizadas em sua maioria pelos hepatócitos e estimuladas por citocinas pró-inflamatórias, estas preponderantemente produzidas por macrófagos, tais como IL-1, IL-6 e o TNF- α (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004; CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). Outros sítios de produção relatados de PFAs incluem os rins, intestino, coração, pulmão, baço, tecido adiposo e demais leucócitos (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005a).

Quanto a sua classificação, as PFAs são divididas em positivas e negativas. As PFAs positivas são aquelas que aumentam suas concentrações séricas enquanto que as PFAs negativas são aquelas que reduzem suas concentrações séricas frente a uma reação de fase aguda (GONZÁLEZ. et al., 2017).

Com a descoberta, a difusão e popularização da eletroforese, a pormenorização das proteínas e sua utilização para diversos fins, inclusive para a monitoração de processos inflamatórios, se fez possível. De acordo com Gruys et al., (2005) para esse tipo de avaliação é recomendado que várias PFAs sejam avaliadas em conjunto, de preferência, comparando animais doentes com animais saudáveis.

2.4. Proteínas séricas *Chelonia mydas*

2.4.1. Proteína contendo o domínio Vitelogenina

A vitelogenina é uma proteína encontrada nos vertebrados ovíparos, atuando como transportadora de lipídios, sendo, fundamental para a formação dos ovos. É uma glicofosfoproteína ligada ao cálcio, de alto peso molecular, caracterizada como um dímero de 500 kDa, composto por dois monômeros idênticos de 200 a 240 kDa (SIFUENTES-ROMERO et al., 2006), sintetizada no fígado pelos hepatócitos sob estímulo de estrógenos produzidos pelos ovários das fêmeas (WALLACE, 1970).

Por estar ligada à reprodução e à formação dos ovos, é uma proteína que usualmente só é encontrada no sangue de fêmeas adultas no estado reprodutivo, estando inativa nos machos e nos animais jovens (CRAIK, 1978; MOSCONI et al., 2002; ZACCARONI et al., 2010).

Produtos químicos naturais e antropogênicos, tais como herbicidas, inseticidas, plastificantes ftalatos e estrogênio sintético, têm o potencial de interferir com as vias hormonais normais afetando a reprodução, o crescimento e a sobrevivência dos

animais (SÁNCHEZ-SARMIENTO, 2013). Essas substâncias são conhecidas como desreguladores endócrinos ou disruptores endócrinos. Um dos mais conhecidos e estudados são aqueles que imitam a ação dos estrógenos fisiológicos, particularmente 17 β -estradiol, sendo portanto, capaz de estimular a produção de vitelogenina em animais nos quais tal proteína não deveria ocorrer, como em machos e animais jovens (SIFUENTES-ROMERO et al., 2006).

2.4.2. Alfa-2-macroglobulina (α 2M) e Alfa-1-antiproteínase (α 1-antitripsina)

Bactérias, células fagocíticas e do sistema imunológico podem produzir proteases, que são enzimas capazes de clivar ligações peptídicas entre os aminoácidos de uma proteína. Tal processo pode exacerbar a lesão tecidual e potencializar um processo inflamatório (ANDRADE et al., 2019).

Proteínas como a alfa-2-macroglobulina (α 2M) e a alfa-antitripsina (α 1-antitripsina) são consideradas PFAs de resposta moderada, de alto peso molecular, podendo apresentar diferentes subunidades ligadas por pontes dissulfeto, sendo amplamente presentes no plasma de vertebrados e invertebrados (GOLLAS-GALVÁN et al., 2003; CHUANG et al., 2013), compondo uma importante frente da resposta inespecífica, do sistema de defesa dos animais, atuando como antiproteases (KANEKO et al., 2008).

A α 2M é considerada um inibidor de endopeptidases ativas de todos os tipos catalíticos. O mecanismo inibitório da α 2M funciona através da formação de uma gaiola tetramérica em torno de proteases ativas, fisicamente obstruindo a interação entre proteases e substratos (VANDOOREN; ITOH, 2021).

A α 1-antitripsina é o componente mais importante entre os “inibidores de proteases”, razão pela qual há aumento em suas concentrações séricas nos processos inflamatórios agudos. Em doenças hepáticas pode-se observar um aumento de sua concentração, nos estágios iniciais da doença e um decréscimo nas fases terminais das hepatopatias, justamente por ser uma proteína de fase aguda sintetizada pelos hepatócitos (NAOUM, 2010).

2.4.3. Ceruloplasmina

A ceruloplasmina é uma glicoproteína pertencente ao grupo das alfa-2. Possui relação intrínseca com o metabolismo cúprico, apresentando em sua estrutura seis átomos de cobre (MONTASER et al., 1992), apesar de não desempenhar funções de transporte ou entrega de cobre aos tecidos (HELLMAN; GITLIN, 2002). Possui função enzimática principal como ferroxidase, auxiliando na conversão/oxidação de Fe²⁺ em Fe³⁺ na membrana citoplasmática das células (KANEKO et al., 2008).

É considerada uma PFA de resposta leve a moderada, aumentando suas concentrações em processos que envolvem dano tecidual e inflamação (CERÓN et al., 2005; SMITH; CIPRIANO, 1987).

2.4.4. Complemento C3

O sistema complemento é composto por várias proteínas que se intercomunicam e se ativam em forma de cascata, que possuem variadas funções na defesa inata e adquirida dos animais, tais quais opsonizar patógenos, recrutar células de defesa como polimorfonucleares e macrófagos, além de atuarem em células apoptóticas, na regulação do processo alérgico e inflamatório (LAMBRIS; SAHU, 2001).

Dentre todas as proteínas do sistema complemento, a mais abundante é a fração C3, correspondendo a aproximadamente 70%. Possui importante papel nas três vias de ativação do sistema complemento (via clássica, alternativa e da lectina), além de ser considerada uma proteína de fase aguda positiva de menor intensidade (KANEKO et al., 2008; LAMBRIS; SAHU, 2001).

2.4.5. Fator de despolarização da actina (FDA)/Cofilina

O fator de despolarização da actina (FDA) compõe uma família de proteína, muitas vezes inserida em um grande grupo nomeado FDA/cofilinas (HOTULAINEN et al., 2005). São pequenas proteínas de ligação à actina, encontradas em todos os eucariotos, com baixa massa molecular, 19 a 21 kDa (BAMBURG; BRAY, 1987; MUNEYUKI et al., 1985).

O FDA promove uma dinâmica de despolarização e separação dos filamentos de actina e esta ação é crítica para vários processos vitais, tais como a citocinese e motilidade celular (HOTULAINEN et al., 2005).

2.4.6. Ovotransferrina

É a segunda proteína mais abundante da clara do ovo de aves e répteis, atrás apenas da ovoalbumina. Sua massa molecular varia de acordo com a espécie, sendo, de 82 kDa em tartarugas de pente e de 66 kDa tartarugas verdes (PRAJANBAN et al., 2012). É uma glicoproteína de ligação ao ferro, que desempenha uma importante função de transferência de íons férricos do oviduto ao ovo, fundamental para a garantia do desenvolvimento do embrião (CHAIPAYANG et al., 2013).

A ovotransferrina além da sua importância no suporte nutricional ao embrião, apresenta atividade antibacteriana (KOVACS-NOLAN et al., 2005). Estudos em aves submetidas experimentalmente a processo inflamatório demonstrou o potencial da ovotransferrina sérica de atuar como uma proteína de fase aguda (XIE et al., 2002).

2.4.7. Albumina

De todas as proteínas plasmáticas, a albumina é a de maior abundância, sendo a PFA negativa de maior relevância. É responsável pela manutenção da pressão coloidosmótica, manutenção do pH, além de atuar no transporte de hormônios, ácidos graxos, colesterol, bilirrubina, medicamentos e várias outras substâncias autóctones e alóctones ao organismo em questão (GONZÁLEZ et al., 2017; KANEKO et al., 2008).

Apesar de ser uma PFA negativa, sua interpretação não é trivial, na medida em que muitas são as causas que desencadeia variações em sua concentração, sobretudo as relacionadas com sua redução, tais como diminuição da síntese pelos hepatócitos, diversas causas de perdas proteicas, quadros severos de desnutrição e processos inflamatórios. Os quadros de hiperalbuminemia são mais raros e geralmente são desencadeados por desidratação (CERÓN et al., 2005; CRAY et al., 2009; ECKERSALL, 2008).

2.4.8. Diidroorotato desidrogenase (quinona)

Esta proteína mitocondrial é uma enzima responsável por catalisar a conversão de L-diidroorotato a orotato, quarta etapa enzimática responsável pela síntese das pirimidinas (VICENTE, 2013). Segundo Carvalho (2008), o peso molecular da enzima expressa em *E. coli*, obtido por SDS-PAGE 15%, foi de 37 kDa.

2.4.9. Imunoglobulina cadeia Kappa região C

Imunoglobulinas são glicoproteínas que atuam como reconhecedoras de antígenos dos linfócitos B. São compostas, estruturalmente, por duas cadeias pesada (P) e duas cadeias leves (L), ligadas por pontes dissulfeto. A parte pesada (gama, mi, alfa, épsilon e delta) versa sobre a classe da imunoglobulina (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD), enquanto que a parte leve da cadeia é representada por kappa (κ) ou lambda (λ) (CHEN et al., 1993; KANEKO et al., 2008).

Cada cadeia leve kappa, polipeptídica, tem uma região amino terminal (N-terminal) variável, contendo o sítio de ligação ao antígeno e uma região carboxi-terminal (C-terminal) de natureza constante, codificada por um gene da região C (JANEWAY et al., 2001).

2.4.10. Proteína serina/treonina quinase - SIK3

Proteínas quinase induzidas por sal (SIK) pertencem a uma subfamília das proteínas quinases ativadas por monofosfato de adenosina (AMPK). Foram assim nomeadas pois a primeira proteína identificada, integrante da subfamília, era regulada pela ingestão de sal na dieta. Dentro da família das AMPK, a subfamília das quinases induzidas por sal são divididas em três quinases (SIK1; SIK2 e SIK3) (BERGGREEN et al., 2012; WEIN et al., 2018).

Estudos em camundongos, com redução da fosforilação do substrato SIK, aumentaram interleucinas anti-inflamatórias e reduziram citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (WEIN et al., 2018).

Uma importante função associada a tais proteínas é a sua capacidade de regular a expressão gênica em respostas a sinais extracelulares que aumentam os

níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). O SIK3 possui uma relação inversamente proporcional de resposta com o cAMP, ou seja, aumento de cAMP provoca uma redução da resposta de SIK3 em adipócitos (BERGGREEN et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar e quantificar o proteinograma sérico, por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE), de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) juvenis, de vida livre, com ou sem a presença de fibropapilomas.

3.2. Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo de eletroforese em gel de poliacrilamida pela técnica de SDS-PAGE que consiga identificar as proteínas séricas em tartarugas verdes;
- Identificar, por meio da proteômica, as proteínas obtidas pela eletroforese;
- Avaliar o potencial da utilização das PFAs como biomarcadores inflamatórios para a espécie;
- Identificar possíveis diferenças da expressão das PFAs entre os grupos;
- Determinar a(s) PFA(s) para a caracterização da fibropapilomatose em tartarugas verdes

•

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Comissão de ética

A realização do presente estudo seguiu todas as Normas de Condutas para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, os princípios éticos para pesquisa animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a Legislação brasileira vigente. O

delineamento experimental foi submetido e avaliado pela supracitada comissão, tendo sido aprovado e registrado sob o protocolo 1051/2021.

4.2. Registro SISBIO

O presente trabalho, por se tratar de um estudo com animais silvestres de vida livre, teve autorização do Sistema de informação e autorização em biodiversidade (SISBIO) do instituto de meio ambiente e recursos naturais renováveis (IBAMA), sob o número de registro 61063.

4.3. Delineamento experimental

4.3.1. Local de estudo

O presente estudo foi realizado durante o mês de maio de 2021, em dois sítios sabidamente de alimentação de tartaruga verde da costa brasileira, o recife de Coroa Vermelha (CV) e a foz dos rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim, localizados no distrito de Santa Cruz (SC). O primeiro local de captura, recife de Coroa Vermelha (CV), está geograficamente mais distante das influências antrópicas, pois dista, aproximadamente, 15 km do município mais próximo, Nova Viçosa, localizado no litoral sul do estado da Bahia (17° 50' S 39° 10' W) (MIGUEL et al., 2022). O recife possui um formato alongado formado por pequenos e isolados pináculos de coral. Há também muitas espécies de recife de águas rasas, como zoantídeos, macroalgas e grama marinha, bem como gastrópodes vermetídeos e algas coralinas (MIGUEL et al., 2022; SILVA et al., 2013b).

Uma espécie de hidrocoral e sete espécies de coral foram identificadas ao longo do recife CV: *Mussismilia harttii*, *Mussismilia hispida*, *Mussismilia braziliensis*, *Agaricia* spp., *Favia* spp., *Siderastrea* spp., *Porites* spp. e a hidrocoral *Millepora alcicornis* (VASCONCELOS, 2014). Na parte sul, no topo do recife, há uma pequena ilha formada por areia carbonatada composta de fragmentos esqueléticos de organismos recifais, onde conchas de microgastrópodes avermelhados são abundantes, o que possivelmente contribuiu para o nome do recife. Esta pequena ilha

fica a cerca de 1m acima do nível do mar, com vegetação esparsa (SILVA et al., 2013b).

O segundo local de captura está localizado no município de Aracruz, norte do estado do Espírito Santo (19° 49' 06" S e 40° 9' 31"). O distrito de Santa Cruz é formado preponderantemente por povos originários e comunidades tradicionais como pescadores e marisqueiras. Os rios Piraquê Açu e Piraquê Mirim se encontram e fluem juntos ao Oceano Atlântico formando um grande complexo estuarino, margeado por uma extensa área de mangue. O litoral faz parte da Área de Proteção Ambiental Costa das Algas, que também engloba o Refúgio de Vida Silvestre de Santa Cruz (MIGUEL et al., 2022). O local apresenta amplo fundo marinho de algas calcárias e não calcárias, biodiversidade de macroalgas, bem como sedimentos biolitolástico e litoclástico, formando um fundo marinho diverso e variado (GASTÃO et al., 2020) que fornece um habitat importante para espécies bentônicas, pelágicas e demersais, incluindo espécies de peixes comerciais e ameaçadas no sudeste do Brasil (MIGUEL et al., 2022). Também é uma área sabidamente de forrageamento de tartaruga verde (IBAMA, 2006). O fundo do mar de Santa Cruz é uma parte considerável dos sedimentos litoclásticos originados do sistema fluvial do rio Doce (SILVA et al., 2013a).

4.3.2. Captura e coleta das amostras

As tartarugas foram capturadas com o auxílio de redes de emalhar de monofilamento de náilon (8 cm de malha de 200 m esticada), as quais eram dispostas paralelamente à corrente marítima, por 8h e monitoradas constantemente a cada 20 minutos, para evitar o afogamento de qualquer animal emaranhado, ou sempre que se identificava o emalhe de alguma tartaruga. Os animais capturados eram levados a bordo para o barco de apoio, com o auxílio de uma embarcação de alumínio de pequeno porte, para coleta de amostras de sangue e parâmetros físicos gerais para avaliação de saúde.

As colheitas sanguíneas foram realizadas, após contenção manual dos animais, por venopunção do seio cervical (OWENS; RUIZ, 1980), com prévia antissepsia com álcool iodado 0,1%, executadas através de sistema Vacutainer®, utilizando agulhas Flashback® 25 x 8 e tubos a vácuo. Quando a coleta com esta

técnica era improdutiva, utilizou-se como alternativa a colheita com seringas de 5 mL ou 10 mL e agulhas de 21 Gauge (G).

O volume de sangue coletado foi calculado, levando-se em consideração que o total de sangue estimado de uma tartaruga corresponde a aproximadamente 5 a 8% do seu peso corporal, e com base na afirmação de que o limite tolerável para coleta sanguínea não deva ultrapassar 0,7% do seu peso corporal (JACOBSON, 1993). Seis esfregaços sanguíneos foram imediatamente confeccionados com sangue fresco (sem a presença de anticoagulante), para melhor preservação da morfologia celular. O sangue coletado foi armazenado em diferentes tubos Vacutainer® contendo heparina lítio (tampa verde) e tubo sem anticoagulante (tampa vermelha), para análises hematológicas e bioquímicas, respectivamente.

A colheita sanguínea foi realizada com o máximo de celeridade, imediatamente após a pesagem, e antes dos demais exames físicos e procedimentos, na busca de se evitar o viés que um eventual estresse pudesse causar nos valores hematológicos.

Os tubos coletados, foram acondicionados em caixas térmicas sob refrigeração com auxílio de gelo reciclável, até serem processados no laboratório base. Importante ressaltar que os tubos foram acondicionados em estantes próprias e o contato com o gelo foi evitado a fim de se mitigar a ocorrência de hemólise. Todas as amostras sanguíneas foram processadas em até 6 horas após a coleta.

4.3.3. Morfometria e avaliação da saúde dos animais capturados

Todos os animais tiveram seus dados morfométricos mensurados, tais como: CCC (incisura nugal até a ponta posterior da carapaça) e largura curvilínea da carapaça (LCC, pontos mais largos), com o auxílio de uma fita plástica flexível (erro de aproximação de 0,1 cm) (BOLTEN, 1999).

Os animais foram classificados como fibropapilomatose presente ou ausente através da inspeção externa na busca da presença ou ausência de qualquer manifestação tumoral visível da doença. Animais com presença de fibropapilomas receberam uma pontuação que considera o número e o tamanho dos tumores, sendo A (<1 cm), B (1–4 cm), C (>4–10 cm) e D (>10 cm), segundo Work e Balazs (1999). Cada categoria, foi classificada segundo o tamanho e localização/região anatômica

tumoral, sendo classificado em leve, moderado e grave, de acordo com para o Índice de Fibropapilomatose do Atlântico Sudoeste (FPSSWA) (ROSSI et al., 2016).

O peso corporal foi mensurado com o auxílio de uma balança de mola (com precisão de 0,1 kg). Após esses procedimentos, os indivíduos foram submetidos a um exame físico para estabelecer o índice condição corporal (ICC), incluindo uma avaliação visual da musculatura torácica, a presença de gordura na musculatura cervical e no pescoço, e a depressão do plastrão concavidade (THOMSON et al., 2009). Com base nesses critérios, o ICC foi pontuado como bom (3), médio (2) ou ruim (1) (WALSH, 1999). Para evitar variação entre observadores, o mesmo pesquisador examinou as tartarugas marinhas durante todo o período de estudo.

Antes da soltura, para uma possível posterior identificação, as tartarugas marinhas receberam uma placa de metal de identificação do Inconel (National Band and Tag Company, EUA, estilo 681) em cada uma das nadadeiras frontais, segundo Limpus (1992), fornecido por Fundação Pró-TAMAR.

4.3.4. Análises laboratoriais

As amostras sanguíneas coletadas a campo foram encaminhadas ao laboratório de apoio sendo processadas segundo suas especificações. Os tubos de heparina seguiram para a hematologia e os tubos para bioquímica foram centrifugados a 3000 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos para obtenção do soro sendo então aliquotados em criotubo de 2ml, estéril, com rosca externa, identificados e armazenados em galão com nitrogênio líquido a -196°C.

4.3.4.1. Análises hematológicas

As contagens totais de glóbulos brancos (WBC), glóbulos vermelhos (RBC) e trombócitos foram realizadas utilizando a diluição de sangue total, heparinizado, em solução comercial de Natt-Herrick, na proporção de 1:100. A solução foi homogeneizada e depositadas em um hemocítômetro (câmara de Neubauer, New Optics, São Paulo, Brasil) (CAMPBELL, 2015).

A contagem do diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos, corados com panótico rápido (Instant-Prov Kit® - Newprov, Brasil), uma

coloração tipo Wright ou Romanovsky modificado. O exame do diferencial leucocitário foi realizado em 100 células, entre heterófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos e basófilos, de acordo com suas características morfológicas. Além da contagem diferencial, o esfregaço sanguíneo foi examinado para o inquérito de possíveis hemoparasitas, bem como para a avaliação da morfologia celular de eritrócitos e trombócitos. A fim de se evitar possíveis vieses de observadores, todas as contagens e avaliações morfológicas foram realizadas por um patologista clínico veterinário com experiência em hematologia de espécies silvestres.

O volume globular (VG) foi realizado pela técnica de microhematócrito StatSpin® (IRIS USA, Inc.), os tubos capilares eram preenchidos com aproximadamente $\frac{3}{4}$ da sua capacidade com sangue, uma extremidade era selada com auxílio de massa de modelar (Soft, Acrilex®), os capilares eram então centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos em centrífuga própria (XC-LED12K; Bio Lion). Com o auxílio de uma régua métrica (StatSpin®; IRIS USA, Inc.) foi mensurado a % da coluna ocupada pelo precipitado das hemácias em relação ao plasma e o valor do volume globular foi obtido. Os valores de hemoglobina (Hb) foram determinados pelo Kit Labtest® comercial em um espectrofotômetro (Quimis Q898DPT, Brasil), após, centrifugação da solução a 5.000 rpm por 5 min (Centribio® 80-2B, Equipar, Brasil) para remover os núcleos de eritrócitos livres após a lise dos eritrócitos, a fim de não interferir na leitura pelo espectrofotômetro.

Os índices eritrocitários volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados a partir, de fórmulas matemáticas, utilizando-se dos valores de hemoglobina, hematócrito e total de hemácias, de acordo com Campbell (2015).

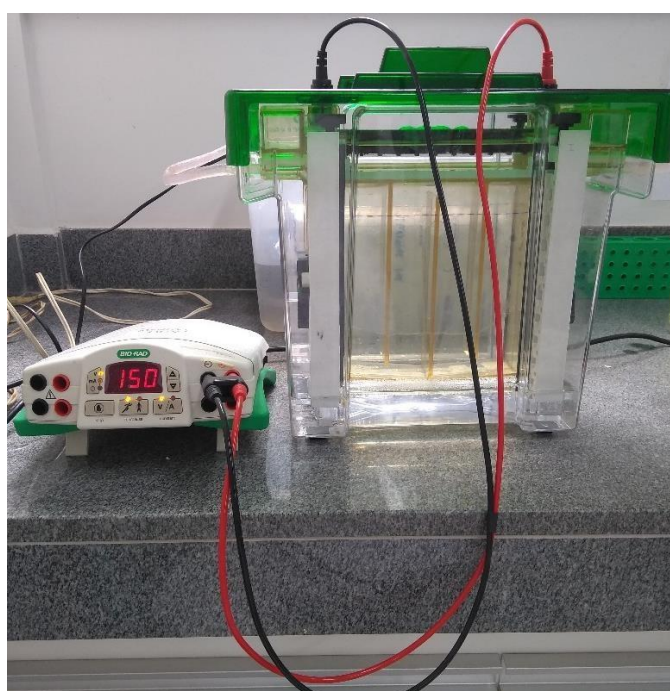
4.3.4.2. Análises bioquímicas

Foram mensurados, em bioquímica convencional úmida (analisador bioquímico automático, HumaStart 300®, Human, In Vitro), os valores de proteína total (método do biureto, com leitura em filtro de 550 nm) e albumina (método do verde de bromo cresol em filtro de 600 nm).

4.3.4.3. Eletroforese de proteínas séricas

Para o fracionamento dos diferentes constituintes proteicos do soro, foi realizada corrida eletroforética das respectivas amostras em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970) modificada. Para a corrida, utilizou-se o sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI - VERTICAL ELETROPHORESIS CELLS® BIO-RAD) (Figura 1).

Figura 1. Sistema vertical de eletroforese



Fonte: LPPCV

Para a eletroforese utilizou-se o gel de separação a 10% e o gel de empilhamento a 4%. Para o preparo das amostras e fracionamento das proteínas, foi adicionado 10 μL de soro sanguíneo diluídos em 30 μL de tampão fosfato-salino (PBS) e 20 μL de gel mix, mistura que foi aquecida em água a ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 10 μL de cada amostra de soro sanguíneo foi depositada em uma determinada cavidade do gel, sendo a primeira e a última amostra de cada gel em duplicata, além da amostra padrão, marcador de peso molecular comercial, (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Strep-tagged, recombinant, 1 ml – 161-0363 – Bio-Rad®) como amostra de referência, sendo sempre adicionada em uma ou mais cavidades pré-estabelecidas.

Depois de inseridas as amostras, o conjunto da cuba foi submetido à corrente elétrica inicial de 100 volts, fornecida por uma fonte de energia elétrica apropriada. Passada uma hora do início da corrida, a corrente elétrica foi aumentada em 50 volts e após mais uma hora foi acrescido mais 50 volts, perfazendo uma corrente elétrica total de 200 volts. Esta corrente permaneceu neste valor até o final da corrida, que durou em sua totalidade, aproximadamente, 6 horas.

Terminada a corrida, a fonte elétrica foi imediatamente desligada e o gel retirado da placa para ser corado durante 30 minutos em solução de azul de Coomassie® R-250 a 0,2 %, sob agitação horizontal constante para uma coloração uniforme. Em seguida, o gel foi submerso em solução descorante a base de metanol e ácido acético, também em agitação horizontal constante, para retirar o excesso de corante, até que todo o gel se apresentasse nítido. Terminado esse processo, o gel foi acondicionado em solução de ácido acético até a fotodocumentação.

Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (Software ImageLab, Loccus®, 2017), a partir do escaneamento das amostras. Para o cálculo do peso molecular foram utilizados os marcadores de pesos moleculares de 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20 kDa. Para a avaliação densitométrica das bandas proteicas confeccionou-se curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

4.3.4.4. Digestão enzimática e dessalinização

As bandas de interesse do SDS-PAGE 1D foram excisadas, picotadas e submetidas à digestão enzimática. O protocolo de digestão enzimática foi procedido conforme descrito anteriormente por Shevchenko et al. (2007). Brevemente, os fragmentos dos géis foram acondicionados em microtubos de 1500 µL contendo 200 µL de acetonitrila 50 % (v/v) em bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0, e submetidos a lavagens para remoção do corante e do SDS. Em seguida, foi realizada a desidratação dos géis adicionando-se, por duas vezes, 200 µL de acetonitrila 100 % em cada microtubo, mantendo-os em repouso por 5 min. Os fragmentos dos géis foram secos por 15 minutos em sistema de centrifugação a vácuo, modelo AG-22331 (Eppendorf, Alemanha).

As proteínas presentes nos fragmentos dos géis foram reduzidas em 100 µL de DTT 65 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0, a 56 °C por 30 min. Em seguida, as proteínas foram alquiladas com 100 µL de iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0, à temperatura ambiente, por 30 min no escuro. Posteriormente, os fragmentos dos géis foram lavados, hidratados e desidratados com bicarbonato de amônio e acetonitrila por duas vezes, respectivamente, e por último, eles foram secos em sistema de centrifugação a vácuo anteriormente referenciado.

Na etapa de proteólise, os fragmentos dos géis foram reidratados em banho-de-gelo, aplicando-se 100 µL de solução de tripsina de pâncreas suíno, indicada para utilização em proteômica, tratada com TPCK, referência V5111 (Promega Corporation, EUA), na concentração final de 25ng/µL em solução de ativação (bicarbonato de amônio 40mM, pH 8,0, e acetonitrila 10%). Após 45 minutos em gelo, foram adicionados 130µL da solução de ativação aos tubos contendo os fragmentos dos géis.

As amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C por 22 horas. Após a proteólise, as amostras foram sonicadas por 10 minutos, agitadas em vórtex por 20 segundos e a solução foi removida para um microtubo limpo. Na sequência, foram adicionados 150µL da solução contendo ácido fórmico 5% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v) aos géis restantes. Cada tubo foi submetido à agitação em vórtex por 20 segundos, mantido em temperatura ambiente por 15 minutos e sonicado por 2 minutos. A solução foi removida e adicionada à solução anteriormente reservada no microtubo limpo. Este passo foi repetido mais uma vez, a solução foi então recolhida e acrescentada ao microtubo limpo. As amostras contendo os peptídeos foram concentradas em sistema de centrifugação a vácuo e armazenadas em freezer -20 °C até o envio para a análise por espectrometria de massas.

4.3.4.5. Espectrometria de massas

Os peptídeos trípticos foram solubilizados em 80 µL de solução aquosa de ácido fórmico 0,1 %, grau de pureza LCMS e acondicionados em tubos apropriados para a aplicação no sistema nano Cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS/MS) utilizado. As análises foram realizadas em um sistema LC-

MS/MS, composto de um UPLC nanoAcquity (Waters, EUA) e um espectrômetro de massas modelo Amazon Ion Trap® (Bruker Daltonics, Alemanha). As amostras foram submetidas a uma análise cromatográfica em uma coluna trap e uma coluna capilar C18 BEH130 1,7µm – 100µm x 100mm, operando com uma taxa de fluxo de 0.400µL/min. Os peptídeos foram eluídos automaticamente e injetados em espectrômetro de massas, atuando no modo *online*, com o auxílio de uma agulha de ionização nanoESI. Nesta etapa, as soluções de fase móvel utilizadas para o programa de gradiente foram: (Solvente A) água e ácido fórmico 0,1% (v/v) e (Solvente B) acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v), com a programação cromatográfica iniciando de um passo de dessalinização com a manutenção de 5% de (B) durante 5 minutos, em seguida, um gradiente consistindo de uma rampa de subida linear partindo de 5% até 50% de (B) durante 40 minutos, 50% de (B) durante 5 minutos, e uma rampa de subida linear partindo de 50% até 90% de (B) durante 10 minutos, 90% de (B) durante 5 minutos, rampa de descida linear partindo de 90% até 10% de (B) durante 5 minutos, seguido pela manutenção a 10% de (B) durante 5 minutos. Os íons foram escaneados em modo positivo para os espectros de MS1 na faixa de massas entre 300 e 1500m/z e MS2 entre 70 e 3000 m/z. A aquisição de dados teve a duração de, aproximadamente, 75 minutos. O espectrômetro IonTrap foi operado no modo auto-MSn, o qual adquiriu espectros de MS2 para os íons mais intensos em cada espectro de varredura completo, excluindo os íons de carga simples. A aquisição dos dados foi gerenciada pelo aplicativo Hystar, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha). Os espectros de massas foram processados com o auxílio dos aplicativos Data Analysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando-se as configurações padrões para proteômica. As listas de picos foram geradas no formato *extensible mark-up language* (*.mzXML) pelo aplicativo CompassXport, versão 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha).

4.3.4.6. Análise dos dados oriundos da espectrometria de massas

As listas de massas com extensão *.mzXML foram confrontadas contra o banco de dados de proteínas da espécie *Chelonia mydas* (download em 05/10/2021, com 19.087 entradas), depositado no *Uniprot Consortium*.

A comparação foi realizada pelo aplicativo PEAKS, versão 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá) (MA et al., 2003). Os parâmetros utilizados para a pesquisa

foram: digestão enzimática pela tripsina, considerando duas clivagens perdidas, no máximo; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Tolerância de erro de 0,2 Da tanto para o íon parental, quanto para os fragmentos. Na análise, foram considerados os íons com carga +2, +3 e +4. As proteínas foram classificadas como identificadas quando apresentassem, pelo menos, dois peptídeos únicos com FDR (*False Discovery Rate*) menor que 1%.

A massa molecular, o ponto isoelétrico, a composição de aminoácidos e outros parâmetros físico-químicos foram calculados por meio da ferramenta ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>), disponível na plataforma *Swiss Bioinformatics Resource Portal – ExPASy* (GASTEIGER et al., 2005). Todos os parâmetros foram calculados com base na sequência de aminoácidos teórica de cada proteína identificada.

A abundância relativa das proteínas foi estimada pela relação entre a soma dos espectros de massa (MS2) dos peptídeos correlacionados a cada proteína identificada e o total de espectros de (MS2) detectados na amostra, com os valores expressos em percentual (CAMUS M et al., 2019).

4.3.4.7. Local de execução das análises laboratoriais

O processamento das amostras bioquímicas foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A eletroforese e a avaliação densitométrica das bandas obtidas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária, no Departamento de Veterinária da UFV e as fotografias dos géis e análises proteômicas foram realizadas no Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol), Casa 21, Vila Gianetti, pertencente à UFV.

4.3.5. Análise estatística

Os resultados foram expressos, quando pertinente, em média \pm desvio padrão. A normalidade dos dados foi verificada pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados que se apresentaram dentro da normalidade foram avaliados por análise

de variância (ANOVA). Em seguida, aplicado o teste *pos hoc* de Tukey quando necessário. Nos casos em que a normalidade não estava presente, o teste não paramétrico de Friedman foi utilizado. Foi adotado o coeficiente de correlação de Pearson para verificar correlações entre as proteínas de fase aguda e os grupos trabalhados. O nível de significância adotada foi de 5 % ($p < 0,05$). Foi empregado o pacote estatístico R.

5. RESULTADOS

Um total de 89 tartarugas marinhas verdes foram capturadas nos locais de estudo, sendo 45 em Coroa Vermelha (CV) e 44 em Santa Cruz (SC).

5.1. Morfometria e avaliação da saúde dos animais capturados

Os animais variaram entre 31 e 67 cm CCC (média de 44,2 cm) e pesavam de 3,0 a 25,75 kg (média de 10,20 kg), resultado que os classificaram, de acordo com os critérios utilizados, como não adultos (juvenis e subadultos) (HIRTH, 1997; SANTOS et al., 2011; BINDACO, 2020). A média do ICC dos animais das duas áreas foi de 2,75. Apenas quatro animais foram classificados como ruim, sendo dois de CV e dois de SC.

Quanto à investigação externa da presença de fibropapilomatose, 28 (31,4%) apresentaram tumores, destes, sete eram de CV e o demais (21 animais), eram provenientes de SC. Ao se classificar tais espécimes de acordo com a proposta do Índice de Fibropapilomatose do Atlântico Sudoeste (FPSSWA) (ROSSI et al., 2016), observou-se que todos os animais de CV foram categorizados como leve (100%), enquanto que dentre os animais de SC, 14 foram classificados como leve (66,7%), três como moderado (14,3%) e quatro como grave (19%).

5.2. Análises hematológicas

Os resultados da hematologia dos animais capturados estão expostos na **Tabela 1**. Todos os esfregaços sanguíneos foram investigados, por busca direta ativa, quanto à presença de hemoparasitas, tendo todos apresentado resultado negativo.

Quando comparado os animais das duas áreas, os animais de SC apresentaram valores significativamente menores de monócitos e eosinófilos. Inversa relação foi observada nos heterófilos, onde os animais de SC apresentaram valor de média superior, quando comparado com os animais de CV.

Tabela 1. Média e desvio-padrão (DP) dos valores de eritograma, leucograma e trombócitos dos animais de CV e SC

Variável	CV		SC		Valor p
	(média ± DP)	n amostral	(média ± DP)	n amostral	
Hemácias	0,486 ± 0,125	44	0,441 ± 0,149	45	0,13
Hemoglobina	6,57 ± 1,74	44	6,83 ± 6,83	45	0,622
Hematócrito	23,71 ± 6,12	44	22,64 ± 8,48	45	0,496
VCM	496,1 ± 99,0	44	516 ± 516	45	0,41
CHCM	27,96 ± 3,45	44	29,88 ± 7,47	45	0,126
Leucócitos	8100 ± 3573	44	7486 ± 2818	45	0,371
Heterófilos	3092 ± 1367	44	3942 ± 1548	45	0,007*
Linfócitos	2595 ± 1755	44	2080 ± 1125	45	0,104
Monócitos	623 ± 443	44	373 ± 305	45	0,003*
Eosinófilos	1780 ± 1216	44	1087 ± 688	45	0,001*
Basófilos	10,6 ± 37,7	44	4,6 ± 17,7	45	0,343
Trombócitos	4536 ± 2533	44	4795 ± 1955	45	0,591

Valores representados por asterisco e em negrito indicam diferença estatística (p<0,05).

5.3. Eletroforese e proteômica

Através da eletroforese, SDS-PAGE, foram identificadas 16 bandas proteicas. Os resultados foram tabelados e expressados em média e DP e apresentados na **Tabela 2.**

Tabela 2. Concentrações das diferentes bandas proteicas (média ± DP) obtidas pela eletroforese SDS-PAGE.

Bandas	Concentração (mg)
Banda 1	327,74 ± 172,38
Banda 2	373,81 ± 213,72
Banda 3	178,46 ± 105,66
Banda 4	165,00 ± 101,33
Banda 5	282,69 ± 99,57
Banda 6	1165,32 ± 501,08
Banda 7	1456,49 ± 917,61
Banda 8	2931,85 ± 335,30
Banda 9	668,34 ± 291,56
Banda 10	799,69 ± 194,47
Banda 11	216,58 ± 70,22
Banda 12	251,15 ± 132,32
Banda 13	261,17 ± 139,07
Banda 14	65,09 ± 37,54
Banda 15	289,24 ± 129,39
Banda 16	1288,24 ± 626,81

Com o auxílio do LC-MS foi possível a estratificação e identificação das bandas por proteínas. Das 16 bandas identificadas e selecionadas na eletroforese, 14 foram passíveis de identificação, pois foram pareadas com proteínas previamente depositados no banco de dados do *Uniprot Consortium*. As bandas 1 e 11 não foram similares a nenhuma proteína conhecida, presente no banco de dados. Para os resultados adquiridos pelo LC-MS, a probabilidade mínima aceita foi de 95 %, com pelo menos, dois peptídeos presentes em cada proteína identificada.

Os resultados proteicos obtidos foram expressos com suas respectivas bandas, acesso e massas teóricas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Identificação nominal das bandas através de LC-MS e massa teórica das proteínas.

Bandas	Proteína	Acesso	Massa teórica (kDa)
Banda 1	-	-	-
Banda 2	Vitellogenin domain-containing protein	M7ANL9	508,7
Banda 3	Alpha-2-macroglobulin	M7C5B9	152,5
Banda 4	Alpha-2-macroglobulin	M7C5B9	152,5
Banda 5	Ceruloplasmin	M7BLB2	175,4
Banda 6	Alpha-2-macroglobulin	M7C5B9	152,5
Banda 7	Complement C3	M7ANH2	177,2
Banda 8	Actin-depolymerizing factor	M7BBQ2	91,7
Banda 9	Ovotransferrin	M7CCE6	74,3
Banda 10	Serum albumin	M7B4N9	127,7
Banda 11	-	-	-
Banda 12	Alpha-1-antitripsina (alfa1 antitripsina)	M7BA20	52,6
Banda 13	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial	M7B5Z3	70
Banda 14	Ig kappa chain C region	M7BF29	16,2
Banda 15	Serine/threonine-protein kinase SIK3	M7BHK3	164
Banda 16	Serine/threonine-protein kinase SIK3	M7BHK3	164

Os resultados foram estratificados e comparados em etapas, da seguinte forma:

Etapa 1 (E1) - Animais com FP x animais sem FP;

Etapa 2 (E2) - Animais de CV x SC;

Etapa 3 (E3) - Animais com FP em CV x animais com FP em SC;

Etapa 4 (E4) - Animais com FP em CV x animais sem FP em CV;

Etapa 5 (E5) - Animais com FP em SC x animais sem FP em SC

Etapa 6 (E6) - Animais com diferentes graduações de FP: leve x moderado x grave

Etapa 7 (E7) - Animais com FP x animais doentes sem FP x animais hígidos

Etapa 1 (E1)

Os animais com FP exibiram uma discrepância em seis bandas em comparação com os animais sem FP, apresentando maiores médias em cinco delas (4;7;8;10;11). A exceção ocorreu na banda 14, onde os animais sem FP registram uma média superior, como demonstrado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Etapa 1 - Animais com FP x animais sem FP

Variável	Com FP (média ± DP)	n amostral	Sem FP (média ± DP)	n amostral	Valor p	Teste estatístico
Banda 1	160,12 ± 57,53	19	136,28 ± 64,61	51	0,329	Mann-Whitney
Banda 2	164,6 ± 49,1	23	143,12 ± 60,20	57	0,102	Mann-Whitney
Banda 3	188,6 ± 77,7	27	162,5 ± 80,2	59	0,118	Mann-Whitney
Banda 4	131,97 ± 45,21	25	110,72 ± 41,21	54	0,040*	Mann-Whitney
Banda 5	112,74 ± 48,37	26	98,77 ± 35,38	53	0,389	Mann-Whitney
Banda 6	151,1 ± 55,2	23	125,63 ± 44,14	52	0,074	Mann-Whitney
Banda 7	383,4 ± 101,8	28	295,9 ± 122,1	60	0,000*	Mann-Whitney
Banda 8	268,9 ± 88,6	28	210,1 ± 96,1	61	0,000*	Mann-Whitney
Banda 9	652,1 ± 285,9	28	614,1 ± 280,1	61	0,596	Mann-Whitney
Banda 10	1739,6 ± 246,9	28	1605,2 ± 253,3	61	0,030*	Mann-Whitney
Banda 11	556,6 ± 149,1	27	455,2 ± 149,3	59	0,002*	Mann-Whitney
Banda 12	286,5 ± 150,4	22	249,5 ± 126,0	51	0,364	Mann-Whitney
Banda 13	1506 ± 569	28	1483,1 ± 662,8	61	0,808	Mann-Whitney
Banda 14	322,8 ± 154,0	26	423,7 ± 203,5	53	0,030*	Mann-Whitney
Banda 15	603,3 ± 154,4	28	600,5 ± 188,9	60	0,833	Mann-Whitney
Banda 16	34,10 ± 14,56	26	30,27 ± 18,76	58	0,162	Mann-Whitney

Valores representados por asterisco e em negrito indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Etapa 2 (E2)

Os animais de CV, quando comparados com os de SC apresentaram diferenças estatísticas significativas em 13 bandas (bandas: 2-12;14;16), como descrito na **Tabela 5**. Das bandas investigadas que apresentaram diferenças estatísticas, os animais de SC exibiram médias maiores em 12 das 13 bandas. A única banda que apresentou um valor de média maior em CV, quando comparado com SC, foi a banda 14 (lg kappa).

Tabela 5. Etapa 2 - Animais de CV x SC

Variável	CV (média ± DP)	n amostral	SC (média ± DP)	n amostral	Valor p	Teste estatístico
Banda 1	131,1 ± 60,3	42	160,3 ± 64,6	28	0,058	Teste T
Banda 2	132,8 ± 50,3	45	170,5 ± 60,4	35	0,003*	Teste T
Banda 3	142,06 ± 29,27	44	203,0 ± 85,1	41	0,002*	Mann-Whitney
Banda 4	102,6 ± 29,27	37	132,28 ± 49,4	41	0,005*	Mann-Whitney

Banda 5	91,28 ± 28,6	41	118,52 ± 49,04	37	0,005*	Mann-Whitney
Banda 6	119,0 ± 43,1	41	150,8 ± 50,3	34	0,004*	Teste T
Banda 7	259,6 ± 68,6	43	388,2 ± 131,3	44	0,000*	Mann-Whitney
Banda 8	182,50 ± 55,13	44	275,9 ± 108,6	44	0,000*	Mann-Whitney
Banda 9	546,2 ± 225,8	44	713,8 ± 305,4	44	0,005*	Mann-Whitney
Banda 10	1516 ± 242	45	1782 ± 199	45	0,000*	Teste T
Banda 11	438 ± 118	43	536 ± 174	43	0,003*	Teste T
Banda 12	225 ± 112	40	303 ± 147	33	0,012*	Teste T
Banda 13	1382 ± 556	45	1601 ± 689	44	0,103	Teste T
Banda 14	510,8 ± 169,3	41	262,3 ± 122,5	37	0,000*	Mann-Whitney
Banda 15	605 ± 172	44	598 ± 185	44	0,846	Teste T
Banda 16	26,50 ± 14,8	44	36,91 ± 18,90	40	0,005*	Mann-Whitney

Valores representados por asterisco e em negrito indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Etapa 3 (E3)

Quando comparados os animais com fibropapilomatose de CV com os de SC, os animais de SC apresentaram diferenças estatísticas significativas em cinco bandas (7;9;10;13;14) (**Tabela 6**). Das bandas investigadas que apresentaram diferenças estatísticas, os animais de SC exibiram maiores médias em quatro das cinco. A única banda que foi estatisticamente superior em CV, quando comparado com SC, foi a banda 14 (lg kappa).

Tabela 6. Etapa 3 - Animais com FP em CV x animais com FP em SC

Variável	FP CV (média ± DP)	n amostral	FP SC (média ± DP)	n amostral	Valor p	Teste estatístico
Banda 1	185,2 ± 47,4	6	148,6 ± 59,8	13	0,206	Teste T
Banda 2	164,6 ± 38,3	7	164,6 ± 54,3	16	1	Teste T
Banda 3	202,4 ± 84,6	7	198,1 ± 99,7	21	0,919	Teste T
Banda 4	106,9 ± 27,2	5	138,2 ± 47,1	20	0,171	Teste T
Banda 5	87,9 ± 26,6	7	127,5 ± 56,3	20	0,088	Teste T
Banda 6	149,1 ± 59,1	7	152,0 ± 55,4	16	0,909	Teste T
Banda 7	315,9 ± 59,1	7	406 ± 104	21	0,040*	Teste T
Banda 8	217,3 ± 59,1	7	286,1 ± 91,2	21	0,075	Teste T
Banda 9	460 ± 172	7	716 ± 290	21	0,037*	Teste T
Banda 10	1567 ± 287	7	1797 ± 209	21	0,030*	Teste T
Banda 11	532,0 ± 49,7	7	597 ± 220	21	0,223	Teste T
Banda 12	243 ± 152	6	303 ± 151	16	0,42	Teste T
Banda 13	1101 ± 267	7	1641 ± 582	21	0,027*	Teste T
Banda 14	472 ± 179	7	268 ± 103	19	0,001*	Teste T
Banda 15	608 ± 144	7	602 ± 161	21	0,923	Teste T
Banda 16	26,3 ± 15,5	7	37,0 ± 13,5	19	0,096	Teste T

Valores representados por asterisco e em negrito indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Etapa 4 (E4) e Etapa 5 (E5)

Ao se comparar animais dentro do mesmo local geográfico, observou-se que, das 16 bandas investigadas, os animais com FP de CV apresentaram diferenças estatísticas significativas em cinco bandas (1;3;6;7;11), com médias maiores em todas, quando comparado com os animais também de CV, porém sem FP, como expresso na **Tabela 7**.

Esta diferença não ocorreu em SC, uma vez que os animais com e sem a presença de FP não apresentaram médias estatisticamente diferentes para nenhuma das bandas analisadas (**Tabela 8**).

Tabela 7. Etapa 4 - Animais com FP em CV x animais sem FP em CV

Variável	Com FP CV (média ± DP)	n amostral	Sem FP CV (média ± DP)	n amostral	Valor p	Teste estatístico
Banda 1	185,2 ± 47,4	6	122,1 ± 57,9	36	0,016*	Teste T
Banda 2	164,6 ± 38,3	7	126,9 ± 50,5	38	0,068	Teste T
Banda 3	202,4 ± 84,6	7	129,9 ± 51,2	38	0,004*	Teste T
Banda 4	106,9 ± 27,2	5	100,6 ± 29,9	33	0,658	Teste T
Banda 5	87,9 ± 26,6	7	90,4 ± 30,3	35	0,840	Teste T
Banda 6	149,1 ± 59,1	7	112,8 ± 37,3	34	0,041*	Teste T
Banda 7	315,9 ± 59,1	7	238,1 ± 238,1	37	0,001*	Teste T
Banda 8	217,3 ± 59,1	7	175,9 ± 51,9	38	0,064	Teste T
Banda 9	460 ± 172	7	531 ± 185	37	0,350	Teste T
Banda 10	1567 ± 287	7	1507 ± 236	38	0,550	Teste T
Banda 11	532,0 ± 49,7	7	420 ± 119	36	0,020*	Teste T
Banda 12	243 ± 152	6	222 ± 106	34	0,681	Teste T
Banda 13	1101 ± 267	7	1434 ± 582	38	0,147	Teste T
Banda 14	472 ± 179	7	520 ± 184	36	0,523	Teste T
Banda 15	608 ± 144	7	624 ± 215	38	0,851	Teste T
Banda 16	26,3 ± 15,5	7	25,2 ± 12,7	36	0,852	Teste T

Valores representados por asterisco e em negrito indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 8. Etapa 5 - Animais com FP em SC x animais sem FP em SC

Variável	Com FP SC (média ± DP)	n amostral	Sem FP SC (média ± DP)	n amostral	Valor p	Teste estatístico
Banda 1	148,6 ± 59,8	13	170,4 ± 68,9	15	0,382	Teste T
Banda 2	164,6 ± 54,3	16	175,5 ± 66,2	19	0,603	Teste T
Banda 3	198,1 ± 99,7	21	221,3 ± 90,2	21	0,433	Teste T
Banda 4	138,2 ± 47,1	20	138,3 ± 62,4	23	0,995	Teste T
Banda 5	127,5 ± 56,3	20	120,8 ± 46,2	19	0,691	Teste T
Banda 6	152,0 ± 55,4	16	165,2 ± 64,9	20	0,525	Teste T
Banda 7	406 ± 104	21	372 ± 153	23	0,399	Teste T
Banda 8	286,1 ± 91,2	21	267 ± 124	23	0,561	Teste T

Banda 9	716 ± 290	21	712 ± 325	23	0,96	Teste T
Banda 10	1797 ± 209	21	1768 ± 193	23	0,631	Teste T
Banda 11	565 ± 565	20	511 ± 176	23	0,31	Teste T
Banda 12	303 ± 151	16	304 ± 147	17	0,983	Teste T
Banda 13	1641 ± 582	21	1564 ± 786	23	0,717	Teste T
Banda 14	268 ± 103	19	256 ± 143	18	0,777	Teste T
Banda 15	602 ± 161	21	594 ± 208	23	0,894	Teste T
Banda 16	37,0 ± 13,5	19	36,8 ± 23,1	21	0,979	Teste T

Valores representados por asterisco e em negrito indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Etapa 6 (E6)

Além dos efeitos geográficos e da presença ou ausência da fibropapilomatose nas diferentes populações, todos os animais, independentemente do local de captura, que apresentavam manifestação visível da fibropapilomatose, caracterizada pelas presença de um ou mais tumores, foram agrupados e distribuídos de acordo com o grau de acometimento da doença, baseado na proposta estabelecida por Rossi et al. (2016), Índice de Fibropapilomatose do Atlântico Sudoeste (FPSSWA). Houve diferenças estatísticas significativas em 4 (5;6;9;16) das 16 bandas investigadas, como descrito na **Tabela 9**.

Tabela 9. Etapa 6 - Diferentes graduações de FP: leve x moderado x grave

Variável	Leve (média ± DP)	n amostral	Moderado (média ± DP)	n amostral	Grave (média ± DP)	n amostral	Valor p
Banda 1	159,6 ± 52,8 a	16	269,7 ± 0 a	1	109,5 ± 25,5 a	2	>0,05
Banda 2	163,8 ± 51,4 a	19	189,01 ± 6,85 a	2	148,3 ± 61,0 a	2	>0,05
Banda 3	191,8 ± 76,3 a	21	334,7 ± 159,8 a	3	136,1 ± 27,7 a	4	>0,05
Banda 4	124,10 ± 41,94 a	18	177,6 ± 65,3 a	3	133,2 ± 33,0 a	4	>0,05
Banda 5	101,23 ± 37,84 a	21	218,8 ± 20,6 b	2	150,3 ± 66,0 ab	4	0,002*
Banda 6	149,7 ± 44,7 a	17	223,8 ± 58,1 ab	3	86,46 ± 4,00 b	3	0*
Banda 7	371,1 ± 89,7 a	21	508,2 ± 158,5 a	3	354,5 ± 72,0 a	4	>0,05
Banda 8	259,5 ± 75,8 a	21	379,3 ± 160,6 a	3	235,4 ± 29,8 a	4	>0,05
Banda 9	589,4 ± 244,4 a	21	1166 ± 175 b	3	596,0 ± 143,8 a	4	0,001* e 0,009*
Banda 10	1712,4 ± 251,4 a	21	1943 ± 323 a	3	1730,0 ± 102,3 a	4	>0,05
Banda 11	553,1 ± 179,0 a	21	780 ± 178 a	3	574 ± 234 a	4	>0,05
Banda 12	267,8 ± 158,1 a	16	404,4 ± 82,6 a	3	268,3 ± 138,1 a	3	>0,05
Banda 13	1433 ± 530 a	21	2113 ± 473 a	3	1433 ± 694 a	4	>0,05
Banda 14	345,4 ± 163,5 a	20	227,8 ± 26,2 a	2	257,5 ± 114,3 a	4	>0,05
Banda 15	602,1 ± 148,0 a	21	758,5 ± 115,5 a	3	493,5 ± 139,8 a	4	>0,05
Banda 16	33,64 ± 13,49 a	19	54,787 ± 1,676 b	3	20,80 ± 2,74 a	4	0,024* e 0,003*

Valores representados por diferentes letras, negrito e por asterisco indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Etapa 7 (E7)

Buscando-se comparar o impacto de outros fatores de doença que não a fibropapilomatose, bem como reduzir o viés que tais fatores pudessem gerar, os animais foram ainda estratificados e comparados da seguinte maneira: animais não doentes x animais doentes sem FP x animais com FP. Os critérios para tal divisão levaram em considerações alguns pontos, a saber: para ser alocado no grupo “NÃO doente” os animais deveriam apresentar ECC = 3, presença de parasitas ≤ 1 e hematócrito (VG) $\geq 22\%$. Os animais que não respeitaram algum desses critérios, e que também não apresentavam manifestação visível de fibropapilomas, foram inseridos no subgrupo “doentes SEM FP”. Por sua vez, os animais que se enquadravam nos critérios supracitados e não apresentavam fibropapilomas visíveis foram alocados no subgrupo “NÃO doente”. Os demais animais, que apresentavam manifestação clínica da fibropapilomatose, independentemente dos critérios estabelecidos supracitados, compuseram o subgrupo animais “doentes COM FP”.

Os resultados foram dispostos na **Tabela 10**, sendo estes diferentes estatisticamente em seis bandas das 16, em comparação a um dos demais subgrupos pertencentes a E7, com médias estatisticamente maiores para o subgrupo “doentes COM FP” em todas as bandas exceto na de número 14 (lg Kappa). O subgrupo “NÃO doentes” apresentou a maior média para a banda 14 (lg Kappa), sendo esta estatisticamente diferente ao subgrupo “doentes COM FP” e sem diferença estatística quando comparada ao subgrupo “doentes SEM FP”.

Tabela 10. Etapa 7 - Animais NÃO doentes x doentes SEM FP x doentes COM FP

Variável	NÃO doentes (média \pm DP)	n amostral	Doentes SEM FP (média \pm DP)	n amostral	Doentes COM FP (média \pm DP)	n amostral	Valor p
Banda 1	136,7 \pm 67,1 a	33	135,5 \pm 61,7 a	18	160,1 \pm 57,5 a	19	0,379
Banda 2	148,51 \pm 58,34 a	36	133,9 \pm 63,6 a	21	164,6 \pm 49,1 a	23	0,212
Banda 3	181,2 \pm 80,4 a	37	123,5 \pm 63,1 b	21	199,2 \pm 94,6 a	28	0,006*
Banda 4	116,60 \pm 48,29 a	34	113,1 \pm 52,2 a	21	131,97 \pm 45,21 a	25	0,352
Banda 5	97,85 \pm 39,61 a	36	106,44 \pm 39,08 a	17	117,2 \pm 52,8 a	27	0,237
Banda 6	145,0 \pm 60,6 a	34	107,50 \pm 34,16 b	19	151,1 \pm 55,2 a	23	0,021*
Banda 7	276,9 \pm 118,6 a	38	316,8 \pm 130,8 ab	22	383,4 \pm 101,8 b	28	0,002*
Banda 8	208,4 \pm 88,0 a	38	210,6 \pm 112,2 ab	22	268,9 \pm 88,6 b	28	0,026*
Banda 9	658,5 \pm 298,9 a	38	535,9 \pm 238,4 a	22	652,1 \pm 285,9 a	28	0,227
Banda 10	1581,1 \pm 247,4 a	38	1632,3 \pm 262,0 ab	22	1739,6 \pm 246,9 b	28	0,043*
Banda 11	465,2 \pm 127,1 a	37	430,6 \pm 183,4 b	21	580,4 \pm 192,9 b	28	0,004*
Banda 12	259,5 \pm 130,5 a	33	231,1 \pm 118,5 a	18	286,5 \pm 150,4 a	22	0,433
Banda 13	1618 \pm 672 a	38	1225 \pm 585 a	22	1506 \pm 569 a	28	0,065
Banda 14	477,0 \pm 213,0 a	34	356,4 \pm 195,0 ab	19	322,8 \pm 154,0 b	26	0,007*

Banda 15	655,0 ± 221,6 a	38	541,6 ± 179,6 a	22	603,3 ± 154,4 a	28	0,092
Banda 16	32,14 ± 20,95 a	37	27,31 ± 14,24 a	20	34,10 ± 14,56 a	26	0,424

Valores representados por diferentes letras, negrito e por asterisco indicam diferença estatística (p<0,05).

6. DISCUSSÃO

Todos os animais foram classificados como não-adultos de acordo com o CCC (HIRTH, 1997; SANTOS et al., 2011; BINDACO, 2020). Este resultado era esperado, considerando que as coletas foram em áreas sabidamente de alimentação de animais juvenis (BAPTISTOTTE, 2007; MIGUEL et al., 2022).

Os animais de SC apresentaram médias mais altas nos valores de heterófilos em comparação com os animais de CV. Semelhante resultado foi encontrado por Work e Balazs (1999), em que os animais mais afetados por FP obtiveram valores mais elevados.

Com relação aos monócitos, esperávamos que os animais de SC apresentassem valores maiores, visto que uma das causas da monocitose é a formação de granulomas (FRYE, 1991). Contudo, tal hipótese não se concretizou.

O resultado dos eosinófilos também foi diverso do previsto, porém, mostrou-se semelhante ao encontrado por Aguirre et al. (1995), no qual os autores previam valores maiores de eosinófilos nos animais mais acometidos pela FP devido à maior propensão ao sangramento dos tumores e o consequente parasitismo por sanguessugas. Entretanto, tal associação não foi constatada.

Os animais com FP exibiram uma discrepância em seis bandas em comparação com os animais sem FP, apresentando maiores médias em cinco delas (4;7;8;10;11). A exceção ocorreu na banda 14, onde os animais sem FP registram uma média superior, como demonstrado na **Tabela 4**. O contraste entre os grupos vai ao encontro dos resultados de Aguirre e Balazs (2000), os quais previamente evidenciaram disparidades no perfil bioquímico de animais com e sem FP, especialmente em relação aos níveis de proteína total e albumina.

A E2 foi a etapa que apresentou maior número de bandas estatisticamente diferentes, um total de 13 (2-12;14;16) das 16 investigadas. Das bandas que apresentaram diferenças estatísticas, os animais de SC apresentaram médias maiores em 12 das 13 bandas, endossando a hipótese de que os animais de CV e de SC são populações que sofrem pressões antrópicas diferentes, como previamente

apontado por Miguel et al., (2022), com distintas expressões nas concentrações proteicas frente ao grau de desafio que o ambiente as impõe.

Das 13 bandas estatisticamente diferentes na E2, a única que exibiu um valor de média maior em CV, quando comparado a SC foi a banda 14 (Ig Kappa), comportamento semelhante ao encontrado na E3, no qual os animais de CV com FP obtiveram maior média que os animais também com FP porém de SC, descartando uma relação direta da banda 14 (Ig Kappa) com a FP, e apontando para outras possíveis causas.

É importante salientar que a banda 14 corresponde a uma imunoglobulina de cadeia kappa (cadeia leve), não sendo possível assumir com precisão o tipo de imunoglobulina. Porém, pelo peso molecular e pela sua concentração possivelmente trata-se de uma IgG de cadeia leve (CARVALHO FILHO et al., 2020; OROZCO et al., 2022; SOUTO et al., 2019).

A banda 5 foi estatisticamente diferente na E6, quando se comparou o grau de FP. Animais classificados como “moderado” apresentaram maior valor de média entre os demais, com resultados estatisticamente diferentes quando comparado com os animais classificados como “leve”, porém, quando comparado com animais graduados como “grave”, não houve diferença estatística. A proteína identificada na banda 5 foi a ceruloplasmina, uma proteína de fase aguda positiva, considerada de resposta leve a moderada frente a danos teciduais e processos inflamatórios (CERÓN et al., 2005; SMITH; CIPRIANO, 1987), o que pode explicar esse padrão de resposta em parábola, com tendência ao retorno aos valores basais.

A proteína preponderante identificada nas bandas 3, 4 e 6 foi a alfa-2-macroglobulina (α 2M). Uma possível explicação para essa dispersão se dá pela sua conformação estrutural, visto que apresenta subunidades ligadas por pontes dissulfeto (GOLLAS-GALVÁN et al., 2003; CHUANG et al., 2013), que quando tratadas com 2-mercaptoetanol sob altas temperaturas tem suas pontes rompidas (LAEMMLI, 1970).

Os animais de CV com FP apresentaram valor de média, estatisticamente significativo, maior que os animais de CV sem FP nas bandas 3 e 6, o que está em consonância com a própria característica da α 2M ser uma PFA positiva de resposta moderada (STOCKHAM; SCOTT, 2008), e assumindo-se que a FP desencadeia um processo inflamatório sistêmico nos animais acometidos.

Ao se estratificar os animais por diferentes graus (E6), observou-se que na banda 6 ($\alpha 2M$) os animais apresentaram um padrão de parábola, sendo os animais agrupados como “graves” os que lograram menor média, sendo esta estatisticamente divergente dos animais agrupados como “leve”. Supõe-se, baseado no perfil de resposta apresentado em parábola, e na própria dinâmica das PFAs, que os animais agrupados como “graves” já apresentaram valores de média elevados, porém, por estarem em um estágio mais avançado (crônico) da FP, sua concentração já não é mais tão elevada.

Analisando a E7, nota-se que os animais doentes SEM FP apresentaram as menores médias nas bandas 3 e 6 ($\alpha 2M$), em comparação com os animais não doentes e com os animais doentes COM FP. Contudo, é necessário ter cautela ao tirar conclusões desse resultado, pois os animais classificados como doentes SEM FP podem estar sujeitos a diversos outros fatores inflamatórios, como metais pesados, conforme descrito por Miguel et al. (2022). Além disso, há a possibilidade de outras doenças ou condições estarem afetando as concentrações proteicas, somada ao fato de os animais estratificados como doentes COM FP serem um grupo heterogêneo, proveniente de locais geográficos distintos, como já mencionado.

Foi identificada como proteína preponderante na banda 7 a fração C3, integrante do sistema complemento. Os animais de SC com FP apresentaram valor de média estatisticamente maior quando comparado com animais com FP, porém de CV. Semelhante fato observa-se quando comparamos animais com FP de CV, versus animais sem FP de CV (E4), em que os animais com FP lograram maior média. De igual modo, os animais doentes com FP apresentaram maior valor de média quando comparado com os animais doentes sem FP e com os animais não doentes (E7), sendo inclusive, estatisticamente superior a estes últimos. Tal fato talvez se explique pelas funções básicas do sistema complemento, quais sejam: promover a lise e fagocitose de células danificadas, bactérias e vírus; regular a resposta imune e inflamatória (EDELWEISS et al., 1997).

Os animais de SC com FP apresentaram maior média para a banda 9, identificada como ovotransferrina, quando comparado com os animais de CV com FP (E3). Como componente dos ovos das aves e répteis, a ovotransferrina já está bem caracterizada, porém sua atuação plasmática ainda carece de robustez, bem como sua relação e atuação frente a processos inflamatórios (PALMITER et al., 1981).

Estudos com aves submetidas experimentalmente a um processo inflamatório tiveram aumento nas concentrações séricas da ovotransferrina, o que fez com que os autores acatassem a hipótese da ovotransferrina atuar como uma proteína de fase aguda positiva em processos inflamatórios (XIE et al., 2002), ao contrário do que se observa em mamíferos, onde a transferrina atua como uma PFA negativa (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005a).

A albumina, banda 10, apresentou valores estatisticamente significativos maiores nos animais de SC, quando comparado com os animais de CV (E2), comportamento que se repetiu entre os animais com FP de SC com os animais acometidos pela FP de CV (E3). Ao comparar todos os animais doentes COM FP com os animais NÃO doentes (E7) a média da albumina do primeiro também foi maior. Tais achados foram inesperados, uma vez que os animais de SC estão sob maior impacto antrópico do que os animais de CV (MIGUEL et al., 2022). Ademais, os animais sujeitos a danos teciduais, acometidos por neoplasias e conseqüentemente em processos inflamatório mais exacerbado, como é o caso dos animais visivelmente acometidos pela fibropapilomatose, supostamente deveriam apresentar redução em seus valores de albumina, uma vez que a esta é considerada uma proteína de fase aguda negativa (CRAY et. al., 2009; ECKERSALL; BELL, 2010; STOCKHAM; SCOTT, 2008).

A banda 11 não foi análoga a nenhuma proteína conhecida, presente no banco de dados, não obstante, apresentou diferenças estatísticas significativas entre os animais com FP de CV e os animais sem FP de CV (E4), com maior média nos primeiros. Quando analisado a E7, os animais doentes com FP também expressam maior valor de média quando comparado com os animais não doentes. Apesar da não identificação nominal/pareamento da proteína preponderante na banda 11, os dois achados supramencionados corroboram para a possibilidade de se tratar de uma proteína de fase aguda positiva.

A diidroorotato desidrogenase (quinona), mitocondrial, banda 13, foi diversa somente na E3, quando comparado os animais com FP de CV com os animais com FP de SC, tendo estes últimos apresentando valor de média maior significativo.

Além da E2, como já discutido, os animais da E3 com FP de CV apresentaram valor de média significativamente maior para a banda 14, quando comparado com os animais também acometidos pela FP, porém de SC. A referida banda trata-se de uma

Ig kappa de cadeia leve, porém tal caracterização é muito ampla, visto que agrupa diferentes classes de anticorpos produzidos/mediadas por linfócitos B sob estímulo de diversos antígenos (ABBAS et al., 2015).

Quando analisado a E2, efeito do local, os animais de SC tiveram média estatística significativamente maior frente aos animais de CV para a proteína serina/treonina quinase - SIK3. Estratificando os animais por grau de fibropapilomatose, E6, os animais agrupados em “moderados” lograram média estatística significativamente maior que os agrupados em “leve” e “grave”, resultado semelhante ao observado em camundongos por WEIN et al., (2018), em que os animais com redução da fosforilação do substrato SIK, tiveram um efeito anti-inflamatório. É preciso rememorar que o processo inflamatório não é uma reta crescente infinita, sendo mais semelhante a um ciclo, com tendência de começo, meio e fim, ou início, pico e resolução. Pelo perfil de parábola observado, supõe-se que os animais agrupados em “moderados” estão no pico máximo de inflamação, enquanto os agrupados em “leves” e “graves” estão no início ou já passaram pelo momento de maior inflamação respectivamente.

7. CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado foram possíveis o fracionamento, a quantificação e a caracterização do proteinograma de tartarugas verdes através da técnica proposta. Foram observadas significativas diferenças entre CV e SC, assim como entre os animais com e sem FP. No entanto, o fator “presença visível da FP”, isoladamente em SC, não demonstrou ser um importante agente modulador do proteinograma para tal população. Em contrapartida, os animais de CV, com e sem FP, apresentaram relevantes diferenças em suas concentrações proteicas. Não houve uma correlação direta de alguma proteína específica caracterizada no estudo com a ocorrência ou ausência da FP, o que sugere que as proteínas identificadas têm um papel limitado como biomarcador para fibropapilomatose em *Chelonia mydas*, visto que elas refletem não apenas a doença estudada, mas também a condição geral do indivíduo e do ambiente no qual ele se encontra. Entretanto, a ausência de uma correlação específica plena não diminui a importância e o potencial promissor das proteínas

estudadas como ferramentas complementares para o estadiamento e a monitoração desta e de outras relações ecológicas.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew J.; PILLAI, Shiv. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ACKERMAN, Ralph. Turtles. *In: The Biology of Sea Turtles*. [s.l: s.n.]. p. 83–106. ISBN: 0849384222.

AGUIRRE, A. A.; BALAZS, G. H. Blood biochemistry values of green turtles, *Chelonia mydas*, with and without fibropapillomatosis. **Comparative Haematology International**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 132–137, 2000. ISSN: 09387714. DOI: 10.1007/s005800070004.

AGUIRRE, A. A.; SPRAKER, T. R.; BALAZS, G. H.; ZIMMERMAN, B. Spirorchidiasis and fibropapillomatosis in green turtles from the Hawaiian Islands. **Journal of Wildlife Diseases**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 91–98, 1998. ISSN: 00903558. DOI: 10.7589/0090-3558-34.1.91.

AGUIRRE, A. Alonso; BALAZS, George H.; SPRAKER, Terry R.; GROSS, Timothy S. Adrenal and Hematological Responses to Stress in Juvenile Green Turtles (*Chelonia mydas*) with and without Fibropapillomas. **Physiological Zoology**, [S. l.], v. 68, n. 5, p. 831–854, 1995. ISSN: 0031-935X. DOI: 10.1086/physzool.68.5.30163934.

AGUIRRE, Alonso; SPRAKER, Terry R.; CHAVES, Anny; DU TOIT, Leslie; EURE, Whitney; BALAZS, George H. Pathology of fibropapillomatosis in olive ridley turtles *lepidochelys olivacea* nesting in costa rica. **Journal of Aquatic Animal Health**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 283–289, 1999. ISSN: 15488667. DOI: 10.1577/1548-8667(1999)011<0283:POFIOR>2.0.CO;2.

ALFARO-NÚÑEZ, Alonzo; BERTELSEN, Mads Frost; BOJESEN, Anders Miki; RASMUSSEN, Isabel; ZEPEDA-MENDOZA, Lisandra; OLSEN, Morten Tange; GILBERT, Marcus Thomas Pius. Global distribution of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus among clinically healthy sea turtles. **BMC Evolutionary Biology**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 206, 2014. ISSN: 14712148. DOI: 10.1186/s12862-014-0206-z. Disponível em:

<http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12862-014-0206-z>. Acesso em: 19 fev. 2021.

ANDRADE, Rayanny; JUNQUEIRA-KIPNIS, Ana Paula; KIPNIS, André. Proteases associated with mycobacterium tuberculosis infection. **Journal of Tropical Pathology**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 1–12, 2019. ISSN: 19808178. DOI: 10.5216/rpt.v48i1.56992.

BALAZS, George H.; FUJIOKA, Roger; FUJIOKA, Carrie. Marine turtle faeces on Hawaiian beaches. **Marine Pollution Bulletin**, [S. l.], v. 26, n. 7, p. 392–394, 1993. ISSN: 0025326X. DOI: 10.1016/0025-326X(93)90187-O.

BALAZS, George H.; POOLEY, Samuel G. **Current status of fibropapillomas in the Hawaiian green turtle, *Chelonia mydas*. Research plan for marine turtle fibropapilloma 1991.**

BAMBURG, J. R.; BRAY, D. Distribution and cellular localization of actin depolymerizing factor. **Journal of Cell Biology**, [S. l.], v. 105, n. 6 I, p. 2817–2825, 1987. ISSN: 00219525. DOI: 10.1083/jcb.105.6.2817.

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

BAPTISTOTTE, C.; SCALFONI, T. J.; GALLO, B. M. G.; SANTOS, A. S.; CASTILHOS, J. C. ...; LIMA, E. H. S. M.; BELLINI, C.; BARATA, P. C. R. Prevalence of sea turtle fibropapillomatosis in Brazil. *In*: COYNE, M. S.; CLARK, R. D. (org.). **ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION**. Philadelphia. p. 21.

BAPTISTOTTE, Cecília. **Caracterização espacial e temporal da fibropapilomatose em tartarugas marinhas da costa brasileira**. 2007. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, [S. l.], 2007.

BELLINI, Claudio; SANCHES, T. M. Reproduction and Feeding of Marine Turtles in the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. **Marine Turtle Newsletter**, [S. l.], v. 74, p. 12–13, 1996.

BENNETT, P.; KEUPER-BENNETT, U.; BALAZS, G. H. Photographic evidence for the regression of fibropapillomas afflicting green turtles at Honokowai, Maui, in the Hawaiian Islands. *In*: (T. Wibbels, H. Kalb, Org.)PROC 19TH ANNUAL SYMPOSIUM OF SEA TURTLE CONSERVATION AND BIOLOGY 1999, Washington. **Anais [...]**. Washington: Tech Memo NMFS-SEFCS-443. US Department of Commerce, NOAA,

1999 p. 37–39.

BERGGREEN, Christine; HENRIKSSON, Emma; JONES, Helena A.; MORRICE, Nicholas; GÖRANSSON, Olga. cAMP-elevation mediated by β -adrenergic stimulation inhibits salt-inducible kinase (SIK) 3 activity in adipocytes. **Cellular Signalling**, [S. l.], v. 24, n. 9, p. 1863–1871, 2012. ISSN: 08986568. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.05.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.05.001>.

BINDACO, ADRIANO LIMA STELZER. **IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA ESOFÁGICA E SUA PROVÁVEL ASSOCIAÇÃO COM LESÕES CASEOSAS OBSTRUTIVAS EM TARTARUGAS- VERDES (Chelonia mydas)**. 2020. UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, [S. l.], 2020. ISSN: 0038092X. ISBN: 9789896540821. Disponível em: <http://journal.um-surabaya.ac.id/index.php/JKM/article/view/2203>.

BJORNDAL, Karen A. Nutritional Ecology of Sea Turtles. **Copeia**, [S. l.], v. 1985, n. 3, p. 736, 1985. ISSN: 00458511. DOI: 10.2307/1444767.

BJORNDAL, Karen A. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. In: LUTZ, P.; MUSICK, J. (org.). **The biology of sea turtles**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1997. p. 199–231.

BOLTEN, A. B. Techniques for measuring sea turtles. In: Eckert, K.L., Bjorndal, K.A., Abreu-Grobois, F.A., Donnelly, M. (Eds.), Research and management techniques for the conservation of sea turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4, Washington. In: [s.l: s.n.]. p. 110–114.

BOWEN, B. W.; MEYLAN, B.; ROSS, J. P.; LIMPUS, C. J.; BALAZS, G. H.; AVISE, J. C. Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. **Evolution**, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 865–881, 1992. ISSN: 00143820. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1992.tb00605.x.

BRILL, Richard W.; BALAZS, George H.; HOLLAND, Kim N.; CHANG, Randolph K. C.; SULLIVAN, Scott; GEORGE, John C. Daily movements, habitat use, and submergence intervals of normal and tumor-bearing juvenile green turtles (*Chelonia mydas* L.) within a foraging area in the Hawaiian islands. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. l.], v. 185, n. 2, p. 203–218, 1995. ISSN: 00220981. DOI: 10.1016/0022-0981(94)00146-5.

BRITO, F. L. C.; MAIA, F. C. L.; DE FRANÇA, L.M.O. ALBUQUERQUE, A.R.

SANTOS, R. A. M.; CAVALCANTI, M. A. M.; GUI- MARÃES, E. S. G. Fibropapillomatosis and multiple fibromas in a Green turtle from the South Cost of Pernambuco State, Brazil. **Marine Turtle Newsletter**, [S. l.], v. 106, p. 12, 2014.

CALDIN, Marco; TASCA, Silvia; CARLI, Erika; BIANCHINI, Silvia; FURLANELLO, Tommaso; MARTINEZ-SUBIELA, Silvia; CERÓN, Jose J. Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions. **Veterinary Clinical Pathology**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 63–68, 2009. ISSN: 02756382. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2008.00087.x.

CAMILLO, Cássia Santos; ROMERO, Renato de Mei; LEONE, Luciano Gerolim; BATISTA, Renata Lucia Guedes; VELOZO, Raquel Sá; NOGUEIRA-FILHO, Sérgio Luiz Gama. Reproduction of sea turtles (Testudines, Cheloniidae) in the Southern Coast of Bahia, Brazil. **Biota Neotropica**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 131–137, 2009. ISSN: 16760603. DOI: 10.1590/s1676-06032009000200013.

CAMPBELL, T. W. Hematologia dos Répteis. *In*: **Thrall, M.A., Weiser, G., Alisson, R., Campbell, T.W. (Eds.), Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. Roca, São Paulo**. [s.l: s.n.]. p. 239–250.

CAMUS M, Hirschi S.; PREVOT G, Chenard MP; MAL H, Stem M.; M, Reynaud-Gaubert; GILHODES J, Burlet-Schiltz O.; BROUSSET P, Colombat M. Proteomic evidence of specific IGKV1-8 association with cystic lung light chain deposition disease. **Blood**, [S. l.], v. 133, p. 2741–2744, 2019.

CARR, A. ...; CARR, M. H. ...; MEYLAN, A. B. The ecology and migrations of sea turtles. The West Caribbean green turtle colony. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, [S. l.], v. 162, p. 1–46, 1978.

CARR, ARCHIE. New Perspectives on the Pelagic Stage of Sea Turtle Development. **Conservation Biology**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 103–121, 1987. ISSN: 15231739. DOI: 10.1111/j.1523-1739.1987.tb00020.x.

CARR, Archie; HIRTH, Harold. **SOCIAL FACILITATION IN GREEN TURTLE SIBLINGS***. [s.l: s.n.].

CARVALHO FILHO, Wilson Pinheiro De; GIRARDI, Fabricia Modolo; SOUTO, Pollyanna Cordeiro; OROZCO, Andrés Mauricio Ortega; DE OLIVEIRA, Thais; DORNELAS, Lorraine Rossi Signorelli Machado; JIMENEZ, Ana Karina Argumedo; FONSECA, Leandro Abreu Da. Profile of Acute-Phase Proteins of Horses Submitted to Low-Level Show Jumping Classes. **Journal of Equine Veterinary Science**, [S. l.],

v. 91, 2020. ISSN: 07370806. DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103105.

CARVALHO, SHEILA GONÇALVES DO COUTO. **Estudos estruturais e funcionais de diidroorotato desidrogenases**. 2008. [S. l.], 2008.

CERÓN, JJ; ECKERSALL, PD;; MARTÍNEZ-SUBIELA, S; Acute phase proteins in dogs and cats: Current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 85–99, 2005 a. ISBN: 1939-165X. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-20444423349&partnerID=40&md5=d56dcb872995fa24754d42b2dcf0667>.

CERÓN, José Joaquín; ECKERSALL, Peter David; MARTÍNEZ-SUBIELA, Silvia. Acute phase proteins in dogs and cats: Current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 85–99, 2005 b. ISSN: 02756382. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x.

CHAIPAYANG, Sukanya; HEAMATORN, Napus; KEHA, Likhid; DADUANG, Sakda; SONGSIRIRITTHIGUL, Chomphunuch; SWATSITANG, Prasan; DHIRAVISIT, Apisak; THAMMASIRIRAK, Sompong. Purification and characterization of ovotransferrin from *Crocodylus siamensis*. **Protein Journal**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 89–96, 2013. ISSN: 18758355. DOI: 10.1007/s10930-012-9461-2.

CHEN, J.; TROUNSTINE, M.; KURAHARA, C.; YOUNG, F.; KUO, C. C.; XU, Y.; LORING, J. F.; ALT, F. W.; HUSZAR, D. B cell development in mice that lack one or both immunoglobulin κ light chain genes. **EMBO Journal**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 821–830, 1993. ISSN: 02614189. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05722.x.

CHUANG, Wen Hsiao; LEE, Kuo Kau; LIU, Ping Chung. Characterization of alpha-2-macroglobulin from groupers. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 389–398, 2013. ISSN: 10959947. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.04.050. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.050>.

COLLAZO, Jaime A.; BOULON, Ralf; TALLEVAST, Teresa L. Abundance and Growth Patterns of *Chelonia mydas* in Culebra, Puerto Rico. **Journal of Herpetology**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 293–300, 1992.

CRAIK, J. C. A. Plasma levels of vitellogenin in the elasmobranch *Scyliorhinus canicula* L. (lesser spotted dogfish). **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 9–18, 1978. ISSN: 03050491. DOI: 10.1016/0305-0491(78)90020-2.

CRAY, Carolyn; BELGRAVE, Rodney L. Haptoglobin quantitation in serum

samples from clinically normal and clinically abnormal horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 337–340, 2014. ISSN: 07370806. DOI: 10.1016/j.jevs.2013.05.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2013.05.007>.

CRAY, Carolyn; VARELLA, Rene; BOSSART, Gregory D.; LUTZ, Peter. Altered in vitro immune responses in green turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 436–440, 2001. ISSN: 10427260. DOI: 10.1638/1042-7260(2001)032[0436:AIVIRI]2.0.CO;2.

CRAY, Carolyn; ZAIAS, Julia; ALTMAN, Norman H. Acute phase response in animals: A review. **Comparative Medicine**, [S. l.], v. 59, n. 6, p. 517–526, 2009. ISSN: 15320820. ISBN: 1532-0820 (Print)n1532-0820 (Linking). DOI: 10.1002/ece3.1939.

CURRY, Sadie S.; BROWN, Daniel R.; GASKIN, Jack M.; JACOBSON, Elliott R.; EHRHART, Llewellyn M.; BLAHAK, Silvia; HERBST, Lawrence H.; KLEIN, Paul A. Persistent Infectivity of a Disease-Associated Herpesvirus in Green Turtles after Exposure to Seawater. **Journal of Wildlife Diseases**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 792–797, 2000. ISSN: 0090-3558. DOI: 10.7589/0090-3558-36.4.792. Disponível em: <http://www.jwildlifedis.org/doi/10.7589/0090-3558-36.4.792>. Acesso em: 19 fev. 2021.

D'AMATTO, A.F. & MORAES-NETO, M. First documentation of fibropapillomas verified by histopathology in *Eretmochelys imbricata*. **arine Turtle Newsletter**, [S. l.], v. 89, p. 12–13, 2000.

DOMICIANO, Isabela Guarnier; DOMIT, Camila; BRACARENSE, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro. The green turtle *Chelonia mydas* as a marine and coastal environmental sentinels: Anthropogenic activities and diseases. **Semina:Ciencias Agrarias**, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 3417–3434, 2017. ISSN: 16790359. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n5p3417.

DOMICIANO, Isabela Guarnier; DOMIT, Camila; RODRIGUES, Ana Paula Frederico; BRACARENSE, Loureiro. The green turtle *Chelonia mydas* as a marine and coastal environmental sentinels: Anthropogenic activities and diseases. **Semina:Ciencias Agrarias**, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 3417–3434, 2017. ISSN: 16790359. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n5p3417.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **Veterinary Journal**, [S. l.], v. 185, n. 1, p. 23–27, 2010. ISSN: 10900233. ISBN: 1532-2971 (Electronic)r1090-0233 (Linking).

DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.04.009. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.009>.

ECKERSALL, P. David. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. **Clinical biochemistry of domestic animals**, [S. l.], v. 6, p. 114–155, 2008.

EDELWEISS, Maria Isabel Albano; MEINE, Henrique Mendes de Mattos; SCROFERNEKER, Maria Lúcia. Importância do sistema do complemento em nefrologia. **J. bras. nefrol**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 32–41, 1997. ISBN: 0101-2800.

ELLIS, Erle C. Anthropogenic transformation of the terrestrial biosphere. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, [S. l.], v. 369, n. 1938, p. 1010–1035, 2011. ISSN: 1364503X. DOI: 10.1098/rsta.2010.0331.

ENE, Ada; SU, Mei; LEMAIRE, Shefali; ROSE, Corinne; SCHAFF, Susan; MORETTI, Richie; LENZ, Jack; HERBST, Lawrence H. Distribution of chelonid fibropapillomatosis-associated herpesvirus variants in Florida: Molecular genetic evidence for infection of turtles following recruitment to neritic developmental habitats. **Journal of Wildlife Diseases**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 489–497, 2005. ISSN: 00903558. DOI: 10.7589/0090-3558-41.3.489. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16244058/>. Acesso em: 19 fev. 2021.

FITZSIMMONS, Nancy N.; LIMPUS, Colin J.; NORMAN, Janette A.; GOLDIZEN, Alan R.; MILLER, Jeffrey D.; MORITZ, Craig. Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial DNA markers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 94, n. 16, p. 8912–8917, 1997. ISSN: 00278424. DOI: 10.1073/pnas.94.16.8912.

FOLEY, Allen M.; SCHROEDER, Barbara A.; REDLOW, Anthony E.; FICK-CHILD, Kristin J.; TEAS, Wendy G. **FIBROPAPILLOMATOSIS IN STRANDED GREEN TURTLES (CHELONIA MYDAS) FROM THE EASTERN UNITED STATES (1980-98): TRENDS AND ASSOCIATIONS WITH ENVIRONMENTAL FACTORS** *Journal of Wildlife Diseases*. [s.l.: s.n.]. Disponível em:
http://meridian.allenpress.com/jwd/article-pdf/41/1/29/2235187/0090-3558-41_1_29.pdf. Acesso em: 19 fev. 2021.

FONSECA, Leandro Abreu Da. **Biomarcadores de estresse e carcinogênese : um estudo em Chelonia mydas**. 2014. UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, [S. l.], 2014.

FORMIA, A. et al. Fibropapillomatosis confirmed in *Chelonia mydas* in the Gulf of Guinea, West Africa. **Marine Turtle Newsletter**, [S. l.], v. 116, n. January, p. 20–22, 2007.

GAGLIARDI, Talita Ribeiro; LOPES, Thaís Cândido; SERAFINI, Thiago ZagoneI. INTERAÇÃO DE TARTARUGAS MARINHAS E A PESCA NO BRASIL: UMA REVISÃO DA LITERATURA. **Arquivos de Ciências do Mar**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 101, 2018. ISSN: 0374-5686. DOI: 10.32360/acmar.v51i1.20354.

GASTÃO, Francisco Gleidson da Costa; SILVA, Lídia Torquato; LIMA JUNIOR, Sergio Bezerra; FERNANDES, Luiz Fernando Loureiro; LEAL, Cláudio Antônio; GOBIRA, Alice Barboza; MAIA, Luis Parente. Marine Habitats in Conservation Units on the Southeast Coast of Brazil. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 22145–22180, 2020. ISSN: 25258761. DOI: 10.34117/bjdv6n4-399.

GASTEIGER, Elisabeth; HOOGLAND, Christine; GATTIKER, Alexandre; DUVAUD, Séverine; WILKINS, Marc R.; APPEL, Ron D.; BAIROCH, Amos. The Proteomics Protocols Handbook. **The Proteomics Protocols Handbook**, [S. l.], p. 571–608, 2005. DOI: 10.1385/1592598900.

GILLIN, C. M. G.; TABOR, M.; AGUIRRE, A. Ecological health and wildlife disease management in national parks. *In*: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. (org.). **Conservation Medicine: Ecological Health in practice**. 1. ed. New York: Oxford, 2002. p. 253–264.

GLAZEBROOK, JS; CAMPBELL, RSF. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. I. Farmed turtles. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 83–95, 1990. ISSN: 0177-5103. DOI: 10.3354/dao009083. Disponível em: <http://www.int-res.com/articles/dao/9/d009p083.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2021.

GOLLAS-GALVÁN, Teresa; SOTELO-MUNDO, Rogerio R.; YEPIZ-PLASCENCIA, Gloria; VARGAS-REQUENA, Claudia; VARGAS-ALBORES, Francisco. Purification and characterization of $\alpha 2$ -macroglobulin from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 134, n. 4, p. 431–438, 2003. ISSN: 15320456. DOI: 10.1016/S1532-0456(03)00002-4.

GONZÁLEZ., Félix H. Diaz; SILVA, Sérgio Ceroni Da; CAMPOS, Rómulo; CERÓM, José Joaquim; DIAZ, Gonzalo J.; POPPL., Alan Gomes. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. [s.l: s.n.]. ISBN: 9788538602859.

GRAY, John S. Biomagnification in marine systems: The perspective of an ecologist. *In: MARINE POLLUTION BULLETIN 2002, Anais [...]*. : Pergamon, 2002 p. 46–52. ISSN: 0025326X. DOI: 10.1016/S0025-326X(01)00323-X.

GREENBLATT, Rebecca J. et al. Geographic variation in marine turtle fibropapillomatosis. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 527–530, 2005. ISSN: 10427260. DOI: 10.1638/04-051.1.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University: Science**, [S. l.], v. 6 B, n. 11, p. 1045–1056, 2005. ISSN: 10093095. DOI: 10.1631/jzus.2005.B1045.

GUIMARÃES, Suzana Machado; GITIRANA, Humberto Mas; WANDERLEY, Amanda Vidal; MONTEIRO-NETO, Cassiano; LOBO-HAJDU, Gisele. Evidence of regression of fibropapillomas in juvenile green turtles *Chelonia mydas* caught in Niterói, southeast Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S. l.], v. 102, n. 3, p. 243–247, 2013. ISSN: 01775103. DOI: 10.3354/dao02542.

HALPERN, Benjamin S. et al. A global map of human impact on marine ecosystems. **Science**, [S. l.], v. 319, n. 5865, p. 948–952, 2008. ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.1149345.

HAMANN, Mark; JESSOP, T. S.; LIMPUS, C. J.; WHITTIER, J. M. Interactions among endocrinology, seasonal reproductive cycles and the nesting biology of the female green sea turtle. **Marine Biology**, [S. l.], v. 140, n. 4, p. 823–830, 2002. ISSN: 00253162. DOI: 10.1007/s00227-001-0755-8.

HARSHBARGER, J. C. Sea turtle fibropapilloma cases in the registry of tumors in lower animals. *In: BALAZS G.H.; POOLEY S.G. (org.). Research plan for marine turtle fibropapilloma*. Honolulu: Tech Memo NMFS-SWFSC-156. US Department of Commerce, 1991. p. 63–70.

HELLMAN, Nathan E.; GITLIN, Jonathan D. Ceruloplasmin metabolism and function. **Annual Review of Nutrition**, [S. l.], v. 22, n. 39, p. 439–458, 2002. ISSN: 01999885. DOI: 10.1146/annurev.nutr.22.012502.114457.

HENDRICKSON, JOHN R. the Green Sea Turtle, *Chelonia Mydas* (Linn.) in Malaya and Sarawak. **Proceedings of the Zoological Society of London**, [S. l.], v. 130, n. 4, p. 455–535, 1958. ISSN: 14697998. DOI: 10.1111/j.1096-3642.1958.tb00583.x.

HEPPEL, S. S.; SNOVER, M. L.; CROWDER, L. B. Sea Turtle Population Ecology. *In*: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A.; WYNEKEN, J. (org.). **The Biology of Sea Turtles volume**. II ed. Florida: CRC Press LLC, 2003. p. 275–306.

HERBST, L. H.; GREINER, E. C.; EHRHART, L. M.; BAGLEY, D. A.; KLEIN, P. A. Serological Turtles Association Infection , From Between and in Fibropapillomatosis. **Journal of Wildlife Diseases**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 496–507, 1995 a.

HERBST, L. H.; JACOBSON, E. R.; KLEIN, P. A.; BALAZS, G. H.; MORETTI, R.; BROWN, T.; SUNDBERG, J. P. Comparative Pathology and Pathogenesis of Spontaneous and Experimentally Induced Fibropapillomas of Green Turtles (*Chelonia mydas*). **Veterinary Pathology**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 551–564, 1999. ISSN: 0300-9858. DOI: 10.1354/vp.36-6-551. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.36-6-551>. Acesso em: 19 fev. 2021.

HERBST, L. H.; JACOBSON, E. R.; MORETTI, R.; BROWN, T.; SUNDBERG, J. P.; KLEIN, P. A. Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 1–12, 1995 b. ISSN: 01775103. DOI: 10.3354/dao022001.

HERBST, L. H.; KLEIN, P. A. Monoclonal antibodies for the measurement of class-specific antibody responses in the green turtle, *Chelonia mydas*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [S. l.], v. 46, n. 3–4, p. 317–335, 1995. ISSN: 01652427. DOI: 10.1016/0165-2427(94)05360-5.

HERBST, Larry; ENE, Ada; SU, Mei; DESALLE, Rob; LENZ, Jack. Tumor outbreaks in marine turtles are not due to recent herpesvirus mutations. **Current Biology**, [S. l.], v. 14, n. 17, p. 697–699, 2004. ISSN: 09609822. DOI: 10.1016/j.cub.2004.08.040.

HERBST, Lawrence H. of Marine Turtles. **Annual Review of Fish Diseases**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 389–425, 1994 a. ISSN: 09598030. ISBN: 0959-8030.

HERBST, Lawrence H. Fibropapillomatosis of marine turtles. **Annual Review of Fish Diseases**, [S. l.], v. 4, n. C, p. 389–425, 1994 b. ISSN: 09598030. DOI: 10.1016/0959-8030(94)90037-X.

HIRTH, H. F. Synopsis of the biological data on the green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758). **Molecular Biology Reports**, [S. l.], v. 97, 1997.

HOTULAINEN, Pirta; PAUNOLA, Eija; VARTIAINEN, Maria K.; LAPPALAINEN, Pekka. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting

rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. **Molecular Biology of the Cell**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 649–664, 2005. ISSN: 10591524. DOI: 10.1091/mbc.E04-07-0555.

HUERTA, PATRICIA; PINEDA, HUMBERTO; AGUIRRE, ALONSO; SPRAKER, TERRY; SARTI1, LAURA; BARRAGÁN, ANA. First confirmed case of fibropapilloma in a leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *In*: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION 2002, Orlando. **Anais** [...]. Orlando p. 193.

IBAMA. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Relatório Final da Proposta de Criação das UC's APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz. Vitória.** [s.l: s.n.].

ICTV, 2022. ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. **2022.** 2022. Disponível em: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202201423&taxon_name=Scutavirus_chelonidalpha5. Acesso em: 25 jan. 2024.

JACOBSON, E. R. **Blood collection technics in reptiles: Laboratory investigations.** *In*: Fowler, M.E. (Ed.), **Zoo and Wild Animal Medicine: Current Therapy 3.** W.B. Sawnder, Philadelphia. [s.l: s.n.].

JACOBSON, E. R.; MANSELL, J. L.; SUNDBERG, J. P.; HAJJAR, L.; REICHMANN, M. E.; EHRHART, L. M.; WALSH, M.; MURRU, F. Cutaneous fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). **Journal of Comparative Pathology**, [S. l.], v. 101, n. 1, p. 39–52, 1989. ISSN: 00219975. DOI: 10.1016/0021-9975(89)90075-3.

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

JANEWAY, C.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **The Immune System in Health and Disease.** 5 th ed., [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>.

KANEKO, Jiro Jerry; HARVEY, John; BRUSS, Michael L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Sixth Edition** (Jiro Jerry Kaneko, John W. Harvey etc.) (z-lib.org). [S. l.], 2008.

KELLER, Jennifer M.; BALAZS, George H.; NILSEN, Frances; RICE, Marc; WORK, Thierry M.; JENSEN, Brenda A. Investigating the potential role of persistent

organic pollutants in Hawaiian green sea turtle fibropapillomatosis. **Environmental Science and Technology**, [S. l.], v. 48, n. 14, p. 7807–7816, 2014. ISSN: 15205851. DOI: 10.1021/es5014054.

KLEIN, Paul A. .. et al. Prevalence and Cultivation of a Chelonid Herpesvirus Associated with Fibropapillomas of the Green turtle , *Chelonia mydas* , and the Loggerhead Turtle , *Caretta caretta* , in Florida. [S. l.], 1998.

KNÖBL, Terezinha; REICHE, Regina; MENÃO, Márcia Cristina. Fibropapilomatose em tartarugas marinhas. **Neotropical Biology and Conservation**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 64–69, 2011. ISSN: 2236-3777. DOI: 10.4013/nbc.2011.61.08.

KOVACS-NOLAN, Jennifer; PHILLIPS, Marshall; MINE, Yoshinori. Advances in the value of eggs and egg components for human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 53, n. 22, p. 8421–8431, 2005. ISSN: 00218561. DOI: 10.1021/jf050964f.

LACKOVICH, Joel K. et al. Association of herpesvirus with fibropapillomatosis of the green turtle *Chelonia mydas* and the loggerhead turtle *Caretta caretta* in Florida. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 89–97, 1999. ISSN: 01775103. DOI: 10.3354/dao037089.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature Publishing Group**, [S. l.], v. 227, p. 680, 1970. Disponível em: <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chnge-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>.

LAMBRIS, John D.; SAHU, Arvind. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. **Immunological Reviews**, [S. l.], v. 180, n. 4, p. 35–48, 2001. ISSN: 0105-2896.

LIMPUS, C. J.; MILLER, J. D. **The occurrence of cutaneous fibropapillomas in marine turtles in Queensland. Proc. Australian Marine Turtle Conservation Workshop 1994.**

LIMPUS, Colin J. Estimation of tag loss in marine turtle research. **Wildlife Research**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 457–469, 1992. ISSN: 10353712. DOI: 10.1071/WR9920457.

LOTZE, Heike K. et al. Depletion degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. **Science**, [S. l.], v. 312, n. 5781, p. 1806–1809, 2006. ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.1128035.

LU, Y.; WANG, Y.; YU, Q.; AGUIRRE, A. A.; BALAZS, G. H.; NERURKAR, V. R.; YANAGIHARA, R. Detection of herpesviral sequences in tissues of green turtles with fibropapilloma by polymerase chain reaction. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 145, n. 9, p. 1885–1893, 2000. ISSN: 03048608. DOI: 10.1007/s007050070063.

LUTCAVAGE, M. E.; PLOTKIN, P.; WITHERINGTON, B.; LUTZ, P. L. Human impacts on sea turtle survival. *In*: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (org.). **The Biology of Sea Turtles**. Florida: CRC Press LLC, 1997. p. 107–136.

MA, Bin; ZHANG, Kaizhong; HENDRIE, Christopher; LIANG, Chengzhi; LI, Ming; DOHERTY-KIRBY, Amanda; LAJOIE, Gilles. PEAKS: Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 17, n. 20, p. 2337–2342, 2003. ISSN: 09514198. DOI: 10.1002/rcm.1196.

MARCOVALDI, M. A.; LAURENT, A. A six season study of marine turtle nesting at Praia do Forte, Bahia, Brazil, with implications for conservation and management. **Chelonian Conservation and Biology**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 55–59, 1996.

MARCOVALDI, Maria Ângela; MARCOVALDI, GUY GUAGNI DEI. Áreas De Desova , Época De Reprodução , Técnicas De Preservação. **Biological Conservation**, [S. l.], v. 91, n. 1, p. 35–41, 1999.

MÁRQUEZ, R. M. Sea turtles of the world: an annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. **FAO SPECIES CATALOGUE**, [S. l.], v. 11, p. 81, 1990. Disponível em: https://www.google.com/search?rlz=1C1CHBD_pt-PTBR920BR920&ei=p8YvYLOWEoa55OUPtdKcmAI&q=MÁRQUEZ%2C+R.M.+1990.+Sea+turtles+of+the+world%3A+an+annotated+and+illustrated+catalogue+of+sea+turtle+species+known+to+date.+FAO+Fish.+Synop.+11+%28125%29%3A+81.&oq=MÁR. Acesso em: 19 fev. 2021.

MATUSHIMA, Eliana Reiko. **Fibropapilomas em tartarugas marinhas: aspectos histológicos, imuno-histoquímicos e ultra-estruturais**. 2003.

MENDONÇA, P.; GROSSMAN, A.; DA COSTA, M. R.; BELLINI, C. MORFOMETRIA DA TARTARUGA VERDE (*Chelonia Mydas*) NA RESERVA BIOLÓGICA MARINHA DO ATOL DAS ROCAS - RN , BRASIL . *In*: XII CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DO MAR - XII COLACMAR 2007, **Anais [...]**. [s.l: s.n.] p. 2006–2008.

MIGUEL, Camila; COSTA, Patrícia Gomes; BIANCHINI, Adalto; LUZARDO,

Octavio Luis Pérez; VIANNA, Monica Ryff Moreira; SANTOS, Marcelo Renan de Deus. Health condition of *Chelonia mydas* from a foraging area affected by the tailings of a collapsed dam in southeast Brazil. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 821, p. 153353, 2022. ISSN: 18791026. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.153353. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153353>.

MILLER, Jeffrey D. Reproduction in sea turtles. *In: The Biology of Sea Turtles, Volume I*. [s.l.: s.n.]. p. 51–81. ISBN: 9781351411295. DOI: 10.1201/9780203737088. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=QNRBDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT75&dq=MILLER,+J.+D.+Reproduction+in+Sea+Turtles.+In:+LUTZ,+P.+L.%3B+MUSICK,+J.+A.+The+Biology+of+Sea+Turtles.+Florida:+CRC+Press+LLC,+1997.+432+p.+Cap.+3,+p.+51-82.&ots=yDX7QFtAH2&>. Acesso em: 19 fev. 2021.

MONTASER, Anahita; TETREAULT, Chantal; LINDER, Maria. Comparison of Copper Binding Components in Dog Serum with Those in Other Species (43437). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 200, n. 3, p. 321–329, 1992. ISSN: 15353699. DOI: 10.3181/00379727-200-43437.

MOREIRA, L.M.P. BAPTISTOTTE, C. SCALFONE, J. T.; THOMÉ, J. ...; ALMEIDA, A. P. L. S. de. Occurrence of *Chelonia mydas* on the Island of Trindade, Brazil. **Marine Turtle Newsletter**, [S. l.], v. 70, p. 2, 1995.

MOREIRA, L. M. P. **Ecologia reprodutiva e estimativa de ninhos da tartaruga verde-aranã – *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Testudines, reptilia) na ilha da Trindade – Espírito Santo – Brasil**. 2003. Universidade Federal do Espírito Santo, [S. l.], 2003.

MORTIMER, Jeanne A.; PORTIER, Kenneth M. Reproductive Homing and Internesting Behavior of the Green Turtle (*Chelonia mydas*) at Ascension Island , South Atlantic Ocean Published by: American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH) Stable URL : <https://www.jstor.org/stable/1445982>. **Copeia**, [S. l.], v. 1989, n. 4, p. 962–977, 1989.

MOSCONI, G.; CARNEVALI, O.; FRANZONI, M. F.; COTTONE, E.; LUTZ, I.; KLOAS, W.; YAMAMOTO, K.; KIKUYAMA, S.; POLZONETTI-MAGNI, A. M. Environmental estrogens and reproductive biology in amphibians. **General and Comparative Endocrinology**, [S. l.], v. 126, n. 2, p. 125–129, 2002. ISSN: 10956840. DOI: 10.1006/gcen.2002.7781.

MROSOVSKY, N. Sex ratios of sea turtles. **Journal of Experimental Zoology**, [S. l.], v. 270, n. 1, p. 16–27, 1994. ISSN: 1097010X. DOI: 10.1002/jez.1402700104.

MUNEYUKI, Eiro; NISHIDA, Eisuke; SUTOH, Kazuo; SAKAI, Hikoichi. Purification of Cofilin, a 21,000 Molecular Weight Actin-Binding Protein, from Porcine Kidney and Identification of the Cofilin-Binding Site in the Actin Sequence. **J. Biochem.**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 563–568, 1985.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. **Veterinary Journal**, [S. l.], v. 168, n. 1, p. 28–40, 2004. ISSN: 10900233. ISBN: 1090-0233. DOI: 10.1016/S1090-0233(03)00119-9.

MUSICK, J. A.; LIMPUS, C. J. Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In: LUTZ, P.; MUSICK, J. A. (org.). **The biology of sea turtles**. Florida: CRC Press. Boca Raton, 1997. p. 137–163.

NAOUM, Paulo Cesar. ELETROFORESES – Hemoglobinas, Proteínas séricas, Lipoproteínas e DNA. **Livraria Santos Editora Ltda., São Paulo**, [S. l.], p. 458, 2010. Disponível em: https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/livros/aceso_gratuito/Livro_completo - Eletroforese.pdf.

NORTON, T. M.; JACOBSON, E. R.; SUNDBERG, J. P. Cutaneous fibropapillomas and renal myxofibroma in a green turtle, *Chelonia mydas*. **Journal of wildlife diseases**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 265–270, 1990. ISSN: 00903558. DOI: 10.7589/0090-3558-26.2.265. Disponível em: <http://www.jwildlifedis.org/doi/10.7589/0090-3558-26.2.265>. Acesso em: 19 fev. 2021.

OROZCO, Andrés Mauricio Ortega et al. ‘Candidatus Mycoplasma Haemoalbiventris’ and Tick-Borne Pathogens in Black-Eared Opossum (*Didelphis aurita*) from Southeastern Brazil. **Microorganisms**, [S. l.], v. 10, n. 10, 2022. ISSN: 20762607. DOI: 10.3390/microorganisms10101955.

OWENS, D. W. Hormones in the Life History of Sea Turtles. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (org.). **The Biology of Sea Turtles**. Florida: CRC Press LLC, 1997. p. 315–342. ISBN: 0849311233.

OWENS, David Wm; RUIZ, Georgita J. New Methods of Obtaining Blood and Cerebrospinal Fluid from Marine Turtles. **Herpetologica**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 17–20, 1980.

PALMITER, R. D.; MULVIHILL, E. R.; SHEPHERD, J. H.; MCKNIGHT, G. S. Steroid hormone regulation of ovalbumin and conalbumin gene transcription. A model based upon multiple regulatory sites and intermediary proteins. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 256, n. 15, p. 7910–7916, 1981. ISSN: 00219258. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)43365-0.

PETERSON, J. L.; COUTO, C. G. Tumores cutâneos e subcutâneos. In: SHERDING, B. (org.). **Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais**. 8. ed. São Paulo: Roca, 1998. p. 238–240.

PRAJANBAN, Bung on; SHAWSUAN, Lao; DADUANG, Sakda; KOMMANEE, Jintana; ROYTRAKUL, Sittiruk; DHIRAVISIT, Apisak; THAMMASIRIRAK, Sompong. Identification of five reptile egg whites protein using MALDI-TOF mass spectrometry and LC/MS-MS analysis. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 75, n. 6, p. 1940–1959, 2012. ISSN: 18743919. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.01.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.004>.

PRANGE, Henry D.; JACKSON, Donald C. Ventilation, gas exchange and metabolic scaling of a sea turtle. **Respiration Physiology**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 369–377, 1976. ISSN: 00345687. DOI: 10.1016/0034-5687(76)90065-7.

PRITCHARD, Peter C. H.; MORTIMER, Jeanne A. Taxonomy , External Morphology , and Species Identification uctur and T axonomic Char acter F igur. **Oceans**, [S. l.], n. 4, p. 1–18, 1999.

QUACKENBUSH, Sandra L. et al. Three closely related herpesviruses are associated with fibropapillomatosis in marine turtles. **Virology**, [S. l.], v. 246, n. 2, p. 392–399, 1998. ISSN: 00426822. DOI: 10.1006/viro.1998.9207. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9657957/>. Acesso em: 19 fev. 2021.

RICKLEFS, R. E. Community diversity: relative roles of local and regional processes. **Science**, [S. l.], v. 235, n. 4785, p. 167–171, 1987. ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.235.4785.167. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/235/4785/167>. Acesso em: 19 fev. 2021.

RODENBUSCH, Carla R.; ALMEIDA, Laura L.; S., Marks; Fernanda; ATAÍDE, Michelli W.; ALIEVI, Marcelo M.; TAVARES, Maurício; PEREIRA, Rosecler Alves Pereira; CANAL, Cláudio W. Detection and characterization of fibropapilloma associated herpesvirus of marine turtles in Rio Grande do Sul, Brazil. **PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA**, [S. l.], v. 32, n. 11, p. 1179–1183, 2012. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

ROSSI, Silmara; SÁNCHEZ-SARMIENTO, Angélica María; VANSTREELS, Ralph Eric Thijl; DOS SANTOS, Robson Guimarães; PRIOSTE, Fabiola Eloisa Setim; GATTAMORTA, Marco Aurélio; GRISI-FILHO, José Henrique Hildebrand; MATUSHIMA, Eliana Reiko. Challenges in evaluating the severity of fibropapillomatosis: A proposal for objective index and score system for green sea turtles (*Chelonia mydas*) in Brazil. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 1–11, 2016. ISSN: 19326203. DOI: 10.1371/journal.pone.0167632.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, ANGÉLICA MARÍA. **Determinação de pesticidas organoclorados em tecidos de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) provenientes da costa sudeste do Brasil: estudo da ocorrência em animais com e sem fibropapilomatose**. 2013. Universidade de São Paulo, [S. l.], 2013.

SANTOS, A. S. et Al. Plano de ação nacional para a conservação das Tartarugas Marinhas. *In*: (M. A. A. G. D. MARCOVALDI, G. SANTOS, A. S. SALES, Org.) SÉRIE ESPÉCIES AMEAÇADAS NO 25 2011, Brasília. **Anais** [...]. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), 2011 p. 21–57.

SANTOS, Alexsandro Santana Dos et al. **Plano de ação nacional para conservação das tartarugas marinhas**. [s.l: s.n.]. ISBN: 9788561842000.

SANTOS, M. R. de D. **Parâmetros bioquímicos, hematócrito e condição corporal no monitoramento da saúde de tartarugas marinhas *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) juvenis selvagens no espírito santo, Brasil**. 2005. [S. l.], 2005.

SANTOS, Marcelo Renan de Deus; FERREIRA, Larissa Santos; BATISTOTE, Cecília; GROSSMAN, Alice; BELLINI, Cláudio. Valores hematológicos de tartarugas marinhas *Chelonia mydas* (Linnaeus , 1758) juvenis selvagens do Arquipélago de Fernando de Noronha , Pernambuco ,. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, [S. l.], v. 46, n. 6, p. 491–499, 2009.

SANTOS, Marcelo Renan De Deus; MARTINS, Agnaldo Silva; BAPTISTOTTE, Cecília; WORK, Thierry M. Health condition of juvenile *Chelonia mydas* related to fibropapillomatosis in southeast Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S. l.], v. 115, n. 3, p. 193–201, 2015. ISSN: 16161580. DOI: 10.3354/dao02883.

SANTOS, Robson G. et al. Coastal habitat degradation and green sea turtle diets in Southeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [S. l.], v. 62, n. 6, p. 1297–1302, 2011 b. ISSN: 0025326X. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2011.03.004. Disponível

em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.03.004>.

SCHLUMBERGER, H. G.; LUCKÉ, Balduin. Tumors of Fishes, Amphibians, and Reptiles. **Cancer Research**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 657–753, 1948. ISSN: 15387445.

SCHMID, Jeffrey R. Marine turtle populations on the west-central coast of Florida: Results of tagging studies at the cedar keys, Florida, 1986-1995. **Fishery Bulletin**, [S. l.], v. 96, n. 3, p. 589–602, 1998. ISSN: 00900656.

SCHRÖDL, Wieland; BÜCHLER, Rita; REINHOLD, Petra; MUCKOVA, Petra; REINDL, Johanna; RHODE, Heidrun. Acute phase proteins as promising biomarkers: Perspectives and limitations for human and veterinary medicine Wieland. **Clinical proteomics journal**, [S. l.], p. 1–34, 2016. ISBN: 8862262752. DOI: 10.1002/prca.201600028.This.

SCHUMACHER, J. Viral diseases. In: MADER, D. R. (org.). **Reptile Medicine and Surgery**. 2. ed. London: W.B. Saunders Company, 1996. p. 224–234.

SHAVER, D. J. Relative abundance, temporal patterns, and growth of sea turtles at the Mansfield Channel, Texas. **Journal of Herpetology**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 491–496, 1994. ISSN: 00221511. DOI: 10.2307/1564963.

SHEVCHENKO, Andrej; TOMAS, Henrik; HAVLIŠ, Jan; OLSEN, Jesper V.; MANN, Matthias. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2007. ISSN: 17542189. DOI: 10.1038/nprot.2006.468.

SIFUENTES-ROMERO, Itzel; VÁZQUEZ-BOUCARD, Celia; SIERRA-BELTRÁN, Arturo P.; GARDNER, Susan C. Vitellogenin in black turtle (*Chelonia mydas agassizii*): Purification, partial characterization, and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for its detection. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 477–485, 2006. ISSN: 07307268. DOI: 10.1897/05-063R2.1.

SILVA, A. E.; SILVA, Q.; VALÉRIA, B.; ALEX, C. Sedimentological sectorization of an estuarine system in a Regressive Coast, Southeast Brazil. **Journal of Sedimentary Research**, [S. l.], v. 83, n. 11, p. 995–1004, 2013 a. ISSN: 15271404. DOI: 10.2110/jsr.2013.78.

SILVA, A. S.; LEÃO, Z. M. A. N.; KIKUCHI, R. K. P.; COSTA, A. B.; SOUZA, J. R. B. Sedimentation in the coastal reefs of Abrolhos over the last decades. **Continental Shelf Research**, [S. l.], v. 70, p. 159–167, 2013 b. ISSN: 02784343. DOI:

10.1016/j.csr.2013.06.002. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.csr.2013.06.002>.

SMITH, G. M.; COATES, Christopher W. **Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles, *Chelonia mydas* (Linnaeus)**. [s.l: s.n.]. v. 23

SMITH, J. E.; CIPRIANO, J. E. Inflammation-induced Changes in Serum Iron Analytes and Ceruloplasmin of Shetland Ponies. **Vet. Pathol**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 354–356, 1987. ISSN: 16000498. DOI: 10.1111/j.1600-0498.1982.tb00663.x.

SOUTO, Pollyana Cordeiro; FONSECA, Leandro Abreu Da; OROZCO, Andres Mauricio Ortega; LOPEZ, Camilo Jose Ramirez; ERMITA, Pedro Ancelmo Nunes; DE CARVALHO FILHO, Wilson Pinheiro; GIRARDI, Fabricia Modolo. Acute-Phase Proteins of Healthy Horses and Horses Naturally Affected by Colic Syndrome. **Journal of Equine Veterinary Science**, [S. l.], v. 80, p. 1–4, 2019. ISSN: 07370806. DOI: 10.1016/j.jevs.2019.06.002. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.06.002>.

STOCKHAM, Steven L.; SCOTT, Michael A. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. [s.l: s.n.]. v. 4 ISBN: 9780813800769.

SWIMMER, J. Y. **Biochemical responses to fibropapilloma and captivity in the green turtle - Pesquisa Google**. 2000. Disponível em:
https://www.google.com/search?q=Biochemical+responses+to+fibropapilloma+and+captivity+in+the+green+turtle&rlz=1C1CHBD_pt-PTBR920BR920&oq=Biochemical+responses+to+fibropapilloma+and+captivity+in+the+green+turtle&aqs=chrome..69i57.1291j0j7&sourceid=chrome&i. Acesso em: 19 fev. 2021.

THOMSON, R. G. **Patologia geral veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. [s.l.] : John Wiley & Sons, 2012.

VAN HOUTAN, Kyle S.; SMITH, Celia M.; DAILER, Meghan L.; KAWACHI, Migiwa. Eutrophication and the dietary promotion of sea turtle tumors. **PeerJ**, [S. l.], v. 2014, n. 1, p. e602, 2014. ISSN: 21678359. DOI: 10.7717/peerj.602. Disponível em:
<https://peerj.com/articles/602>. Acesso em: 19 fev. 2021.

VANDOOREN, Jennifer; ITOH, Yoshifumi. Alpha-2-Macroglobulin in Inflammation, Immunity and Infections. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 12, n.

December, p. 1–20, 2021. ISSN: 16643224. DOI: 10.3389/fimmu.2021.803244.

VASCONCELOS, Mayanne Jesus Oliveira. Os corais construtores da estrutura Holocênica do Recife da Coroa Vermelha, Abrolhos, Bahia. *[S. l.]*, p. 94, 2014.

VICENTE, Eduardo Festozo. **Uso de peptídeos sintéticos no estudo da proteína diidroorotato desidrogenase humana (HsDHODH)**. 2013. *[S. l.]*, 2013.

WALLACE, Robin A. Studies on amphibian yolk IX. Xenopus vitellogenin. **BBA - General Subjects**, *[S. l.]*, v. 215, n. 1, p. 176–183, 1970. ISSN: 03044165. DOI: 10.1016/0304-4165(70)90400-9.

WALSH, M. Rehabilitation of sea turtles. In: Eckert, K.L., Abreu-Grobois, F.A., Donnelly, M. (Eds.), Research and management techniques for the conservation of sea turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4, Washington, DC, pp. 200–207. *In: [s.l: s.n.]*. p. 200–207.

WEIN, Marc N.; FORETZ, Marc; FISHER, David E.; XAVIER, Ramnik J.; KRONENBERG, Henry M. Salt-Inducible Kinases: Physiology, Regulation by cAMP, and Therapeutic Potential. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, *[S. l.]*, v. 29, n. 10, p. 723–735, 2018. ISSN: 18793061. DOI: 10.1016/j.tem.2018.08.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.08.004>.

WHELAN, C. J.; SCHMIDT, K. A. Food acquisition, processing and digestions. *In: STEPHENS, D. W.; BROWN, J. S.; YDENBERG, R. C. (org.). Foraging: behavior and ecology*. Chicago: University of Chicago Press, 2007. p. 576.

WIBBELS, Thane. Critical Approaches to Sex Determination in Sea Turtles. **The Biology of Sea Turtles**, *[S. l.]*, v. II, p. 103–134, 2003. DOI: 10.1201/9781420040807.ch4.

WITHERINGTON, Blair; HIRAMA, Shigetomo; HARDY, Robert. Young sea turtles of the pelagic Sargassum-dominated drift community: Habitat use, population density, and threats. **Marine Ecology Progress Series**, *[S. l.]*, v. 463, p. 1–22, 2012. ISSN: 01718630. DOI: 10.3354/meps09970.

WORK, T. M.; DAGENAIS, J.; BALAZS, G. H.; SCHETTLE, N.; ACKERMANN, M. Dynamics of Virus Shedding and In Situ Confirmation of Chelonid Herpesvirus 5 in Hawaiian Green Turtles With Fibropapillomatosis. **Veterinary Pathology**, *[S. l.]*, v. 52, n. 6, p. 1195–1201, 2015. ISSN: 15442217. DOI: 10.1177/0300985814560236.

WORK, Thierry M.; BALAZS, George H. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. **Journal of Wildlife Diseases**, *[S. l.]*,

v. 35, n. 4, p. 804–807, 1999. ISSN: 00903558. DOI: 10.7589/0090-3558-35.4.804.

WORK, Thierry M.; BALAZS, George H.; WOLCOTT, Mark; MORRIS, Robert. Bacteraemia in free-ranging Hawaiian green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 41–46, 2003. ISSN: 01775103. DOI: 10.3354/dao053041.

WORK, Thierry M.; RAMEYER, Robert A.; BALAZS, George H.; CRAY, Carolyn; CHANG, Sandra P. Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii. **Journal of Wildlife Diseases**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 574–581, 2001. ISSN: 00903558. DOI: 10.7589/0090-3558-37.3.574.

WORK, Thierry M.; RASKIN, Rose E.; BALAZS, George H.; WHITTAKER, Scott D. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. **American Journal of Veterinary Research**, [S. l.], v. 59, n. 10, p. 1252–1257, 1998. ISSN: 00029645.

WYNEKEN, Jeanette. The Anatomy of Sea Turtles: Introduction. **National Marine Fisheries Service, National Oceanic and Atmospheric Administration, US Department of Commerce**, [S. l.], n. December, p. 1–172, 2001.

XIE, H.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M.; HOLT, P.; RATH, N. C. Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens. **Poultry Science**, [S. l.], v. 81, n. 1, p. 112–120, 2002. ISSN: 00325791. DOI: 10.1093/ps/81.1.112. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/ps/81.1.112>.

ZACCARONI, Annalisa; ZUCCHINI, Marina; SEGATTA, Lorenzo; GAMBERONI, Matteo; FREGGI, Daniela; ACCORSI, Pier A.; SCARAVELLI, Dino; GARDNER, Susan C. Vitellogenin (VTG) conservation in sea turtles: Anti-VTG antibody in *Chelonia mydas* versus *Caretta caretta*. **Physiological and Biochemical Zoology**, [S. l.], v. 83, n. 1, p. 191–195, 2010. ISSN: 15222152. DOI: 10.1086/648486.