



FIBROPAPILOMATOSE EM TARTARUGAS VERDES (*Chelonia mydas*) DA BAHIA – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ChHV 5

Carla R. Rodenbusch¹, Thais T. Pires², Cecília Baptistotte³, e Cláudio W. Canal¹

¹ Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9090. CEP 91540-000, Porto Alegre, RS (carlarodenbusch@yahoo.com.br).

² Fundação Pró-Tamar, Av. Garcia D'ávila s/n°. CEP 48280-000. Praia do Forte, Mata de São João – BA (thais.vet@tamar.org.br).

³ Centro Tamar ICMBio, Av. Paulino Muller, 1111. CEP 29040-715, Vitória, ES (cecilia@tamar.com.br).

Palavras-chave: fibropapilomatose, tartaruga verde, *Chelonia mydas*, herpesvírus, PCR.

Introdução

A fibropapilomatose (FP) é uma doença neoplásica caracterizada por um único ou múltiplos crescimentos fibroepiteliais cutâneos, com uma superfície verrugosa ou plana, e aparecendo como fibromas nas vísceras (Kang *et al.* 2008). Os tumores se localizam ao redor dos olhos, na conjuntiva, cavidade oral, pescoço, nadadeiras, cauda, áreas axilares e inguinais e também em órgãos viscerais. O tamanho varia de poucos milímetros até 30 centímetros de diâmetro e os tumores podem causar a morte do animal por interferir na visão, locomoção, alimentação, respiração; já os tumores viscerais podem ser invasivos e prejudicar a função do órgão afetado (George 1997; Yu *et al.* 2000).

O primeiro registro de FP na costa brasileira é de 1986. Entre 2000 e 2004, de 4.471 tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) examinadas 14,96% apresentavam tumores. A prevalência de tumores por ano foi de 12,91% (2000, n = 604), 14,96% (2001, n = 809), 14,79% (2002, n = 818), 19,95% (2003, n = 842) e 12,95% (2004, n = 1398) (Baptistotte *et al.* 2005).

O padrão de disseminação da doença durante surtos em tartarugas-verdes de cativeiro consiste com uma etiologia contagiosa. Um herpesvírus (chelonid herpesvirus 5 – ChHV 5) tem sido identificado em fibropapilomas (Herbst *et al.* 1995; Davison *et al.* 2009) e está presente em 100% dos tumores induzidos por inoculação de filtrados de células tumorais (Ene *et al.* 2005) e em 95% das infecções naturais, sendo que em 79% dos fibropapilomas e fibromas analisados por PCR em tempo-real quantitativo, o vírus estava presente em níveis que excediam 10⁴ cópias por 100 ng de DNA total de tumores (Quackenbush *et al.* 2001).

O presente estudo tem como objetivo detectar e quantificar o ChHV 5 em fibropapilomas de tartarugas-verdes do litoral da Bahia.

Metodologia

Fragmentos dos tumores foram coletados com instrumental cirúrgico estéril e mantidos congelados até o processamento. Os tumores foram macerados com uma solução de PBS na proporção de 0,05 g para cada 5 mL. A extração de DNA foi realizada com 200 microlitros do sobrenadante de acordo com Chomcinsky (1993).



Dois microlitros de DNA em um volume final de 50 µl foram submetidos a PCR com os primers específicos para a DNA polimerase do herpesvírus de tartaruga como descritos por Quackenbusch *et al.* (2001). Cinco microlitros de cada reação de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%.

As amostras foram ainda submetidas a PCR em tempo real (qPCR) para a determinação do número de cópias de DNA do vírus. Os primers e sonda utilizados foram os descritos por Quackenbusch *et al.* (2001) que amplifica um fragmento de 86 pb do gene da DNA polimerase do vírus. As curvas padrão utilizadas nas reações foram diluições log seriadas do plasmídeo "GTHV DNA pol". O plasmídeo "GTHV DNA pol" foi construído através da inserção de um fragmento de 483 pb do gene da DNA polimerase do herpesvírus em um vetor, seguindo as instruções do fabricante do kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen).

Resultados e Discussão

Durante os meses de julho de 2009 a abril de 2010, foram coletadas 38 amostras de fibropapilomas de 20 tartarugas verdes no estado da Bahia, sendo que de 7 tartarugas foram coletados apenas um tumor e das demais de 2 a 3 tumores de locais diferentes do corpo do animal.

Das 20 tartarugas, 12 foram positivas na PCR em pelo menos uma amostra de tumor e 14 foram positivas na qPCR. Das sete tartarugas que foram coletados apenas um tumor, cinco foram negativas em ambas as técnicas e duas foram positivas na qPCR com carga viral de 1,35 e 5.758,80 cópias de DNA do vírus/ mg de tecido. Das 13 tartarugas que foram coletados mais de um tumor, uma apresentou resultado negativo em ambas as técnicas; seis apresentaram pelo menos um resultado negativo na PCR, mas positivo na qPCR e seis apresentaram resultado positivo em ambas as técnicas com uma carga viral variando de 278,33 a 389.909,85 cópias de DNA do vírus/mg de tecido (média de $41.954,69 \pm 105.594,20$). O valor de cópias de genoma por mg de tecido foi calculado multiplicando o valor encontrado na qPCR por 7,5 que corresponde as diluições realizadas durante a extração de DNA. A curva padrão teve um coeficiente de correlação > 0.9 . O ChHV 5 está presente em 100% dos tumores induzidos por inoculação de filtrados de células tumorais (Ene *et al.* 2005) e em 95% das infecções naturais, sendo que em 79% dos FPs e fibromas analisados por PCR em tempo-real quantitativo, o vírus estava presente em níveis que excediam 10^4 cópias por 100 ng de DNA total de tumores (Quackenbush *et al.* 2001).

Quanto as características dos tumores, 86,84% estavam localizados na região anterior do corpo das tartarugas; 50% eram pigmentados, 81,6% apresentavam a superfície verrugosa e 18,4% lisa. Baptistotte (2007) caracterizou a ocorrência da GTFP em tartarugas na costa brasileira analisando 10.170 tartarugas marinhas durante os anos de 2000 a 2005. Das 8.359 tartarugas verdes analisadas, 1.288 apresentavam tumores. A média de prevalência nacional das tartarugas-verdes foi de 15,41% no período. A maioria dos tumores (72,5%) estava localizada na região anterior corpórea do animal, 25,2% na região posterior e 2,3% na carapaça e plastrão, sendo que nenhum tumor foi observado na cavidade oral.

O presente trabalho é o primeiro que relata a quantificação da carga viral em amostras de fibropapilomas no Brasil. Os dados mostram que alguns tumores podem apresentar uma alta carga viral. No Brasil, o DNA do herpesvírus já havia sido detectado por PCR em amostras de fibropapiloma e sangue de tartarugas marinhas em São Paulo (Monezi *et al.* 2006).



Agradecimentos/Financiadores

Agradecemos ao Projeto TAMAR pelo auxílio nas coletas, ao IBAMA pela licença de pesquisa e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

Baptistotte, C., L.M.P. Moreira, J.H. Becker, G. Lopes, J.C. Castilhos, E. Lima, A. Grossman, J. Wanderlinde, e M.A. Marcovaldi. 2005. Frequency of occurrence of tumors in green turtles, *Chelonia mydas* record by Projeto TAMAR-IBAMA in Brazilian coast from years 2000 to 2004. *19th Annual Meeting of the Society for Conservation Biology* 14-15.

Baptistotte, C. 2007. *Caracterização especial e temporal da fibropapilomatose em tartarugas marinhas da costa brasileira*. Tese de Doutorado, ESALQ/USP. Piracicaba.

Chomczynski, P.A. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from the cell and tissues samples. *Biotechniques* 15:532-537.

Davison, A.J.; R. Eberle, B Ehlers, G Hayward, D.J. McGeoch, A.C. Minson, P.E. Pellett, B. Roizman, M.J. Studdert, e E. Thiry. 2009. The order Herpesvirales. *Archives of Virology* 154:171-177.

Ene, A., S. Lemaire, C. Rose, S. Schaff, R. Moretti, J. Lenz, e L.H. Herbst. 2005. 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 Disease* 41:489-497.

George, R.H. 1997. Health problems and diseases of sea turtles. Páginas 363-385 in Lutz P.L., E J.A. Musick (Eds.) *The biology of sea turtles*, vol. I. Boca Raton, USA: CRC Press.

Herbst, L.H., E.R. Jacobson, R. Moretti, T. Brown, J.P. Sundberg, e P.A. Klein. 1995. Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extract. *Disease of Aquatic Organisms* 22:1-12.

Kang, K.I., F.J. Torres-Velez, J. Zhang, P.A. Moore, P.D. Moore, S. Rivera, e C.C. Brown. 2008. Localization of fibropapilloma-associated turtle herpesvirus in Green Turtle (*Chelonia mydas*) by in-situ hybridization. *Journal of Comparative Pathology* 139:218-225.

Monezi, T.A., N.M.G. Muller, E.R. Matushima, S. Rossi, M. Rondon, e D.U. Mehnert. 2006. Detecção de herpesvírus em tumor e sangue de tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas* mantidas na base do Projeto TAMAR, Ubatuba-SP, nos anos de 2005 e 2006. *Anais do 10º Congresso e XV Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens*, p. 21.

Quackenbusch, S.L., R.N. Casey, R.J. Murcek, T.A. Paul, T.M. Work, C.J. Limpus, A. Chaves, L. Dutoit, J.V. Perez, A.A. Aguirre, T.R. Spraker, J.A. Horrocks, L.A. Vermeer, G.H. Balazs, e J.W. Casey. 2001. Quantitative analysis of herpesvirus sequences from normal tissue and fibropapillomas of marine turtles with real-time PCR. *Virology* 287:105-111.

Yu, Q., Y. Lu, V.R. Nerurkar, e R. Yanagihara. 2000. Amplification and analysis of DNA flanking known sequences of a novel herpesvirus from green turtle with fibropapilloma. *Archives of Virology* 145:2669-2676.

