UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE VETERINÁRIA COMISSÃO DE ESTÁGIO

FIBROPAPILOMATOSE EM TARTARUGAS MARINHAS

Derek Blaese de Amorim

PORTO ALEGRE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE VETERINÁRIA COMISSÃO DE ESTÁGIO

FIBROPAPILOMATOSE EM TARTARUGAS MARINHAS

Elaborado por: Derek Blaese de Amorim Orientador: Prof. Marcelo Meller Alievi Co-orientadora: M. V. Michelli Westphal

de Ataíde

Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para a obtenção da Graduação em Medicina Veterinária.

PORTO ALEGRE

A524f Amorim, Derek Blaese de

Fibropapilomatose em tartarugas marinhas / Derek Blaese de Amorim - Porto Alegre: UFRGS, 2010/1.

31f.; il. – Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Comissão de Estágio, Porto Alegre, BR-RS, 2010/1. Marcelo Meller Alievi, Orient., Michelli Westphal de Ataíde, Co-Orient.

1. Chelonia mydas 2. Fibropapilomatose 3. Herpesvírus I. Alievi, Marcelo Meller, Orient. II. Ataíde, Michelli Westphal, Co-Orient. III. Título.

CDD 619

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marcelo Meller Alievi, orientador de monografia e grande mestre durante toda a graduação.

À Michelli Westphal de Ataíde – co-orientadora de monografia, sempre disposta à me ajudar- independente da hora que eu precisasse.

Ao meu orientador de campo – M.V. Msc. Max Rondon Werneck – pelo conhecimento transmitido irrestritamente e pela oportunidade oferecida em uma das fases mais importantes da graduação de um acadêmico – o estágio curricular.

À professora Mary Jane T. De Matos Gomes, minha supervisora de estágio, por ser tão paciente e dedicada no auxílio desta etapa.

À M. V. Carla Rodenbusch, pela sua colaboração na elaboração desta monografia.

Aos amigos, parentes e profissionais que fizeram parte desta jornada.

Aos animais, meu agradecimento, meu respeito, minha dedicação,

À Deus.

RESUMO

A fibropapilomatose (FP) é uma doença debilitante caracterizada por múltiplos tumores cutâneos benignos que afeta principalmente tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*). Sua etiologia é desconhecida, mas suspeita-se que o agente responsável pela doença seja um herpesvírus. A FP ocorre principalmente em animais que possuem comprimento curvilíneo de carapaça entre 40 e 80 centímetros. Acredita-se que a etiologia esteja também associada à vários outros fatores - como infecções bacterianas, radiação ultravioleta, contaminantes químicos, ectoparasitos - e não somente à um agente primário. As lesões são caracterizadas por simples ou múltiplas massas tumorais, com variação do tamanho de 0,1 à mais de 30 centímetros de diâmetro. Baseado nas caracterísitcas histológicas, a doença pode ser dividida em três tipos de lesões proliferativas: papilomas cutâneos, fibromas e fibropapilomas. Os tumores podem estar localizados nas nadadeiras, olhos, base da cauda, regiões da boca, cervical, inguinal, axilar, cloacal e da carapaça e também podem ser observados em órgãos internos, como pulmões, fígado, trato gastrintestinal e rins. O procedimento terapêutico recomendado é a excisão dos tumores com o animal anestesiado.

Palavras-chave: Chelonia mydas, fibropapilomatose, herpesvírus.

ABSTRACT

Fibropapillomatosis (FP) is a debilitating disease characterized by multiple benign tumors that primarily affects green turtles (Chelonia mydas). Its etiology is unknown, but it is suspected that the agent responsible for the disease is a herpesvirus. FP occurs mainly in animals with curve carapace length between 40 and 80 cm. It is believed that the etiology is also associated with several other factors - such as bacterial infections, ultraviolet radiation, chemical contaminants, ectoparasites - not only to a primary agent. The lesions are characterized by single or multiple tumor masses, with size variation from 0.1 to more than 30 cm of diameter. Based on histology, the disease can be divided into three types of proliferative lesions: cutaneous papillomas, fibromas and fibropapillomas. Tumors may be localized in the fins, eyes, base of the tail, regions of the mouth, cervical, inguinal, axillary, cloaca and carapace. It can also be observed in internal organs like lungs, liver, gastrointestinal tract and kidneys. The recommended therapeutic procedure is the tumor's excision with the animal anesthetized.

Keywords: Chelonia mydas, fibropapillomatosis, herpesvirus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Paciente C. mydas	20
Figura 2. Medição dos fibropapilomas	22
Figura 3. NAE após 15 dias da excisão dos fibropapilomas	23

LISTA DE QUADROS

Quadro 2. Escore de tumor	
---------------------------	--

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%: porcentagem

CCC: comprimento curvilíneo de carapaça

cm: centímetro

FP: fibropapilomatose

FPHV: fibropapillomatosis herpesvirus

GTFP: green turtle fibropapillomatosis

IM: intramuscular

IUCN: International Union for Conservation of Nature

kg: quilograma

NAD: nadadeira anterior direita

NAE. nadadeira anterior esquerda

SID: uma vez ao dia

UV: ultravioleta

LISTA DE MEDICAMENTOS

NOME COMERCIAL PRINCÍPIO ATIVO		LABORATÓRIO	
Banamine®	Flunixin meglumine	Schering-plough	
Cloridrato de lidocaína	Cloridrato de lidocaína	Hipolabor	
Flotril 10%®	Enrofloxacino	Schering-plough	
Visserex®	Própolis em solução alcoólica	Pronatu	

SUMÁRIO

1	INTRODUÇAO	10
2	TARTARUGAS MARINHAS	12
2.1	Chelonia mydas	12
3	FIBROPAPILOMATOSE	14
3.1	Histórico	14
3.2	Epidemiologia	14
3.2.1	Prevalência	15
3.3	Etiopatogenia	16
3.4	Lesões	18
3.5	Classificação	19
3.6	Diagnóstico	20
3.7	Quadro clínico	20
3.8	Tratamento	21
3.9	Relato de caso	21
4	CONCLUSÃO	26
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1 INTRODUÇÃO

A história natural da *C. mydas* é difícil de ser estudada por causa das longas escalas de tempo e espaço envolvidas. Os animais recém eclodidos e jovens migram entre os habitats de alimentação durante seu crescimento e os espécimes adultos migram entre os locais de alimentação e reprodução por centenas de quilômetros (BOWEN et al., 1992).

Atualmente, as maiores ameaças às tartarugas marinhas são: destruição do habitat, poluição, pesca incidental, coleta de ovos, matança de fêmeas e, mais recentemente, a fibropapilomatose (HERBST, 1994).

A fibropapilomatose em tartarugas marinhas foi primeiramente descrita em uma espécime de *Chelonia mydas*, em decorrência desse fato a doença foi inicialmente denominada de "Green Turtle Fibropapillomatosis" (GTFP), ou fibropapilomatose da tartaruga-verde, de acordo com Smith e Coates, em 1938, citado por George (1997).

No Brasil, o primeiro caso registrado da doença ocorreu no estado do Espírito Santo, em 1986. Desde então, novas ocorrências foram observadas de maneira crescente nas áreas de alimentação de tartarugas marinhas (BAPTISTOTTE, 2007) no País e também em vários outros locais.

A etiologia da fibropapilomatose ainda não está completamente elucidada (HERBST, 1994). Inúmeros pesquisadores realizam estudos na área e com o conhecimento adquirido sobre a doença até o momento, suspeita-se que o agente etiológico seja um herpesvírus.

Acredita-se também que a etiologia da GTFP esteja associada à outros fatores além de um agente primário, como infecções bacteriana e ectoparasitos (GEORGE, 1997).

Os fibropapilomas são caracterizados por simples ou múltiplas massas tumorais com variação de tamanho de 0,1 à mais do que 30 centímetros de diâmetro, podendo ser verrucosos ou lisos, sésseis ou pedunculados, sendo raros os casos de animais que apresentam apenas um único tumor. Podem estar localizados nas nadadeiras, olhos, base da cauda, regiões da boca, cervical, inguinal, axilar, cloacal e da carapaça. (GEORGE, 1997; HERBST et al., 1998; HERBST, 1994).

Apesar de se tratar de um tumor benigno, as massas tumorais podem comprometer a capacidade funcinal dos membros do animal, dificultando o nado, ou ainda interferir na visão, alimentação e/ou respiração (JACOBSON et al., 1989;AGUIRRE et al., 2004). A presença de tumores em órgãos internos pode resultar no comprometimento do funcionamento destes, por exemplo: Tumores no pulmão causando alterações na flutuabilidade e na luz do intestino causando obstruções (GEORGE, 1997).

Baseado nas suas características histolológicas, esta doença tem sido dividida em três tipos de lesões proliferativas: Papilomas cutâneos, fibromas e fibropapilomas (HERBST, 1994).

O diagnóstico pode ser realizado clinicamente pela presença das massas tumorais, mas deve haver confirmação por análise histopatológica (HERBST et al., 1995) e o tratamento para a doença é a excisão das massas tumorais juntamente com margem de segurança (FUTEMA et al., 2004).

Este estudo propõe uma revisão sobre a fibropapilomatose em tartarugas marinhas.

2 TARTARUGAS MARINHAS

Os quelônios surgiram na Terra há mais de 200 milhões de anos e inicialmente habitavam apenas o ambiente terrestre. Esses animais primitivos evoluíram ao longo do tempo e adaptaram-se à diferentes hábitats, podendo ser encontrados hoje, além do ambiente terrestre (jabutis), em ambientes dulcícolas (cágados, tigres d'água e tracajás) e marinhos (tartarugas marinhas) (BECKER, 2010).

As tartarugas marinhas exitem à mais de 150 milhões de anos, pertencem à classe Reptilia e como tais possuem a pele seca e coberta por placas de queratina. São animais ectotérmicos, cuja sua temperatura varia de acordo com a mudança da temperatura ambiente. (CUBAS et al., 2007), sendo a tartaruga de couro a única exceção, pois possui controle parcial da temperatura corporal (BECKER, 2010).

Com a evolução, os quelônios perderam os dentes e adquiriram bico córneo, mais adaptado para sua dieta. As tartarugas sofreram uma série de adaptações para a vida no oceano: O casco tornou-se mais leve e achatado, ganhando hidrodinâmica, as patas transformaram-se em potentes nadadeiras e a glândula de sal desenvolveu-se para realizar a excreção do excesso de sal no ambiente marinho (BECKER, 2010).

Atualmente, existem sete espécies de tartarugas marinhas: a tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), a cabeçuda (*Caretta caretta*), a de couro (*Dermochelys coriacea*), de pente (*Eretmochelys imbricata*), a oliva (*Lepidochelis olivacea*), "ridley" (*Lepidochelys kempii*) e "kikila" (*Natator depressus*). Dessas, as cinco espécies citadas inicialmente ocorrem no litoral brasileiro e suas ilhas oceânicas (BECKER, 2010).

2.1 Chelonia mydas

Popularmente denominada de tartaruga-verde ou aruanã, essa espécie possui carapaça de cor verde ou verde acinzentado escuro com quatro pares de placas laterais justapostas e o plastrão é de coloração branca. A medida curvilínea média do casco é de 115,6 centímetros de comprimento e o peso médio de um adulto de tartaruga-verde é de 230 quilos. Possui cabeça pequena com um par de escudos pré-frontais, quatro pares de escudos pós orbitais e ranfoteca serrilhada. As nadadeiras anteriores possuem uma unha visível. (MARQUÉZ, 1990). Enquanto filhote, é uma espécie onívora, tornando-se basicamente herbívora quando atinge trinta centímetros.

Habita normalmente profundidades de até 20 metros. (ANDRADE, 2006). É uma espécie cosmopolita, encontrada em águas tropicais e subtropicais (CUBAS et al., 2007). Vivem normalmente em águas costeiras com muita vegetação, sendo raramente avistadas em alto mar (MARQUÉZ, 1990). As principais áreas de nidificação e alimentação estão nos trópicos (ANDRADE, 2006).

No Brasil, as áreas de desova concentram-se nas ilhas oceânicas de Atol das Rocas, Rio Grande do Norte; em Fernando de Noronha, em Pernanbuco e Trindade, no Espírito Santo. As áreas de alimentação da tartaruga-verde no Brasil estão distribuídas ao longo do litoral desde Ceará até Rio Grande do Sul, com agrupamento em regiões com costões rochosos, parcéis, lajes, ilhas e ilhotas, locais esses que normalmente apresentam proliferação de algas (ANDRADE, 2006).

A *C. mydas* é caçada em muitos lugares para consumo de sua carne e ovos. Entretanto, está ocorrendo um leve aumento no número de ninhos em diversas áreas monitoradas em todo o mundo, fazendo com que esta espécie esteja numa situação mais estável em relação às outras espécies de tartaruga marinha (ANDRADE, 2006). Apesar disso, a espécie está listada como espécie em perigo de extinção pela IUCN (2010).

A história natural da *C. mydas* é difícil de ser estudada por causa das longas escalas de tempo e espaço envolvidas. Os animais recém eclodidos e jovens migram entre os habitats de alimentação durante seu crescimento e os espécimes adultos migram entre os locais de alimentação e reprodução por centenas de quilômetros. Sendo assim, os movimentos de ambos são difíceis de serem acompanhados no ambiente marinho (BOWEN et al., 1992).

Os filhotes realizam uma deriva passiva ocasionada pelas correntes marinhas após a eclosão dos ovos. Essa fase pelágica é denominada como "ano perdido", o qual varia de acordo com a espécie, sendo que a tartaruga-verde permanece nessa fase até atingir cerca de 25cm de comprimento de carapaça (MEYLAN; MEYLAN, 2000). As tartarugas marinhas passam a maior parte do seu ciclo de vida nos habitats de alimentação e desenvolvimento (BALAZS, 1980).

Atualmente as maiores ameaças à estes quelônios marinhos são: destruição do habitat, poluição, pesca incidental, coleta de ovos, matança de fêmeas e, mais recentemente, a fibropapilomatose (HERST, 1994).

3 FIBROPAPILOMATOSE

3.1 HISTÓRICO

A fibropapilomatose em tartarugas marinhas foi descrita primeiramente em uma espécime de *Chelonia mydas*. Por esta razão foi inicialmente denominada de "Green Turtle Fibropapillomatosis" (GTFP), ou fibropapilomatose da tartaruga-verde, de acordo com Smith e Coates, em 1938, citado por George (1997). Segundo Herbst (1994) no mesmo ano Lucké observou tumores similares em uma tartaruga-verde capturada em *Cape Sable*, na Flórida, nos Estados Unidos.

Hendrickson observou a ocorrência de massas fibrosas em fêmeas no momento da desova em Sarawak, Indonésia e Malásia em 1958. Nesse mesmo ano, ocorreu o primeiro registro de fibropapilomatose no estado do Havaí, nos Estados Unidos (HERBST, 1994).

Desde o primeiro registro, espécimes de tartarugas-verdes com fibropapilomatose têm sido observadas com frequência crescente no Havaí (BALAZS 1991). Na costa leste dos Estados Unidos, a ocorrência de tumores em tartarugas-verdes encalhadas aumentou de 10% - no início de 1980 – para mais de 30% - no final de 1990 (FOLEY et al., 2005).

No Brasil, o primeiro caso registrado da doença ocorreu no estado do Espírito Santo, em 1986. Desde então, novas ocorrências foram observadas de maneira crescente nas áreas de alimentação de tartarugas marinhas (BAPTISTOTTE, 2007).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

A fibropapilomatose acomete animais juvenis, sub-adultos e adultos. Não existem registros da doença em filhotes (HERBST, 1994), sendo observado principalmente em espécimoes que encontram-se nas zona nerítica (HERBST el al., 2004). A doença tem sido observada com maior frequência em animais jovens com comprimento de carapaça de 40 à 90 cm e peso entre 10 e 30 kg, sendo que nestes animais são encontradas lesões em maior quantidade e tamanho (GEORGE 1997).

Segundo Ehrart (1991), os indivíduos jovens são mais afetados pela doença tendo lesões mais extensivas, com isso o número de indivíduos adultos doentes é menor, o que leva a crer que a maioria dos animais afetados deve morrer antes de atingir a idade adulta. Isso

significa que, além de diminuir a longevidade da espécie, a doença também impede que as tartarugas cheguem à fase reprodutiva dificultando a luta contra a extinção.

Existem diversas hipóteses sobre o momento que as tartarugas se infectam com o FPHV. Uma delas sugere que elas poderiam adquirir o vírus na fase inicial das suas vidas, incluindo os períodos pré-natal, eclosão ou na zona pelágica. Elas poderiam também adquirir a infecção em fases mais tardias da vida, após migrarem da zona pelágica para os hábitats neríticos (ENE et al., 2005).

A doença vem sendo observada nos Oceanos Atlâncico, Pacífico e Índico, com distribuição nas áreas tropicais por todo o mundo. Tartarugas que habitam águas costeiras, áreas com grande concentração humana e áreas com menor circulação de água – como lagunas – têm uma maior ocorrência de fibropapilomatose do que indivíduos que vivem em águas mais profundas e mais distantes da costa. (GEORGE, 1997).

Apesar de acometer principalmente tartarugas da espécie *Chelonia mydas*, a fibropapilomatose também foi observada em *Caretta caretta* (HERBST, 1994); em *Lepidochelis olivacea* (AGUIRRE et al., 1999); em *Lepidochelis kempii* (HARSHBARGER, 1991); e *Dermochelys coriacea* (HUERTA et al., 2002).

3.2.1 Prevalência

Entre 2000 e 2005, Baptistotte (2007) analisou 10.170 tartarugas marinhas em toda a costa brasileira, caracterizando a ocorrência de fibropapilomatose em todo o litoral do Brasil. Foram observados fibropapilomas em 1.288 das 8.359 (15,41%) tartarugas-verdes analisadas; das 1.243 tartarugas de pente analisadas, 2 apresentavam tumores(0,16%); das 250 tartarugas-cabeçudas, 5 apresentaram os tumores(2%); das 288 tartarugas-oliva, 3 apresentaram FP (0,96%) e nenhuma das 30 tartarugas-de-couro observadas apresentaram massas tumorais. O comprimento curvilíneo de carapaça (CCC) mínimo dos animais afetados foi de 30 cm e o máximo foi de 112 cm. A prevalência de FP aumentou até o CCC atingir 80 cm e, após esse valor, decresceu abruptamente.

Baptistotte (2007) também caracterizou a doença em um grupo de 202 animais no Espírito Santo. Nesse grupo, o número médio de fibropapilomas por animal foi de 21 tumores, com variação do número de tumores de um à 179 em um único espécime. A maioria dos tumores estavam localizados na região anterior do corpo do animal (72,5%), 25,2% na região posterior e 2,3% no casco (carapaça e plastrão). Não foram observados tumores na

cavidade oral. A maioria dos tumores (51,27%) apresentaram tamanho entre 1 e 4 cm, 40,61% apresentaram tamanho menor que 1 cm e somente 8,12% possuíam tamanho entre 4,1 e 10 cm. Na Indonésia, foi observada a presença de tumores maiores na região posterior do corpo – cloaca e região entre a cloaca e final do plastrão (ADNYANNA et al.,1997)

A prevalência da fibropapilomatose é maior em ambientes marinhos que sofrem com o impacto da atividade antrópica (Ene et al., 2005). Assim, a epidemiologia da fibropapilomatose pode ser utilizada como ferramenta para o monitoramento da saúde de ecossistemas marinhos em hábitats próximos da costa (AGUIRRE; LUTZ, 2004).

3.3 ETIOPATOGENIA

A etiologia da fibropapilomatose ainda é desconhecida. O aparecimento repentino em novas localidades, a variação da prevalência em locais próximos e a observação da recuperação de alguns animais são fortes indícios de que o causador da doença seja um agente infeccioso (HERBST, 1994).

Provavelmente, a etiologia da GTFP esteja associada à vários outros fatores e não somente à um agente primário. Infecções bacterianas, radiação ultravioleta, contaminantes químicos, ectoparasitos entre outros agentes — ou a associação desses fatores - podem tornar o sistema imune da tartaruga marinha menos competente e contribuir para o desenvolvimento da doença (GEORGE, 1997).

Em estudos experimentais, Herbst e Klein (1995) demonstraram que a GTFP pode ser transmitida para animais não afetados através da inoculação de homogenados celulares de fibropapilomas, sugerindo uma origem infecciosa. Nesses casos, os primeiros tumores aparecem entre a 15ª e 43ª semana após a inoculação, sendo histologicamente indistinguíveis dos tumores na infecção natural.

Estudos subsequentes indicaram a relação da ocorrência de fibropapilomatose com a ação de um alpha herpesvirus, nomeado "chelonid fibropapilloma associated herpesvirus" (C-FP-HV), o qual está presente em 100% dos tumores de ocorrência natural e dos tumores induzidos por inoculação experimental em tartarugas mantidas em cativeiro (ENE et al., 2005).

A circulação do vírus na corrente sanguínea de tartarugas foi confirmada por Monezi e colaboradores (2006), ao analisarem 16 amostras de sangue de tartarugas na base de Ubatuba do Projeto TAMAR-ICMBio.

Foram identificadas quatro variantes para o C-FP-HV, as quais foram denominadas de "A", "B", "C" e "D" em três localidades: Florida West Central Coast, Florida Keys & Bay e Indian River Lagoon. A variante "A" foi observada em espécimes de C. mydas dos três locais estudados e também em tartarugas da espécie C. caretta em Florida Keys & Bay; a variante "B" foi encontrada em C. mydas em Indian River Lagoon; a variante "C" foi observada em Chelonia mydas e Caretta caretta em Florida Keys & Bay e em Lepidochelys olivacea na localidade de Florida West Central Coast e a variante "D" foi observada em um único espécime de C. caretta em Florida Keys & Bay (ENE et al., 2005). Segundo os autores, baseando-se no fato de que as tartarugas das três áreas venham de uma população pelágica mista, observar-se-ia uma distribuição homogênea das variantes virais caso a infecção ocorresse nas fases iniciais do ciclo de vida das tartarugas marinhas, quando ainda encontramse no ambiente pelágico. Contudo, observou-se uma heterogeneidade na distribuição das quatro variantes de C-FP-HV, reforçando a hipótese de que os animais adquirem a infecção quando chegam, ainda jovens, no habitat nerítico.

Greendblatt e colaboradores (2005) com a análise uma sequência de 23.055 pares de bases do genoma dos herpesvirus associados à fibropapilomatose demonstraram que o vírus está organizado da mesma forma que o gênero *Alphaherpesvirinae*.

Segundo Curry e colaboradores (2000), os herpesvírus são associados com diversas doenças de tartarugas marinhas, como a doença do pulmão, olhos e traquéia (LETD), a gray patch disease (GPD) e a fibropailomatose (GTFP).

Existem, no total, seis herpesvírus que acometem as tartarugas marinhas, todos pertencentes à família *Herpesviridae*. Desses, dois pertencem à subfamília *Alphaherpesvirinae*: o vírus ChHV 5 – que é o vírus associado à fibropapilomatose - e o ChHV 6 - associado à LETD. Os demais pertencem à família *Gammaherpesvirinae*, sendo chamados de ChHV 1 (associado à GPD), ChHV 2, ChHV 3 e ChHV 4.

Herbst e Klein (1995) levantaram a hipótese de que contaminantes químicos possam induzir o vírus latente à infecção ou também que esses contaminantes causem imunosupressão no animal, facilitando o desenvolvimento ou a persistência da FP - uma vez que muitos contaminantes químicos são conhecidos por causarem supressão do sistema imunológico.

Os ectoparasitos marinhos (sanguessugas) do gênero *Ozobranchus* são apontados como potenciais vetores de transmissão do herpesvírus associado à GTFP uma vez que podem carrear o DNA viral. Alguns exemplares chegam a apresentar até 10 milhões de cópias do DNA viral (GREENBLATT et al., 2004).

Segundo Curry e colaboradores (2000), provavelmente a habilidade do virus causador da fibropapilomatose em ser transmitido entre as tartarugas marinhas no habitat é influenciada pela habilidade do agente em manter a infecção por longos períodos no ambiente marinho.

3.4 LESÕES

Os fibropapilomas são caracterizados por simples ou múltiplas massas tumorais com variação de tamanho de 0,1 à 30 centímetros de diâmetro (GEORGE, 1997). Os tumores individuais podem ser verrucosos ou lisos, sésseis ou pedunculados (GEORGE, 1997). Grandes massas cutâneas são frequentemente ulceradas e necróticas (HERBST, 1994). São raros os casos de animais que apresentam apenas um único tumor (HERBST et al., 1998). Segundo Herbst (1994), os fibropapilomas podem estar localizados nas nadadeiras, olhos, base da cauda, regiões da boca, cervical, inguinal, axilar, cloacal e da carapaça.

Apesar de se tratar de um tumor benigno, aqueles que atingem grande extensão podem comprometer a capacidade funcinal dos membros do animal, dificultando o nado, ou ainda - quando localizados na região periorbital - eventualmente obstruir a visão (JACOBSON et al., 1989). Os tumores orais podem interferir na alimentação e na respiração (AGUIRRE et al., 2004).

A fibropapilomatose também pode ser observada em órgãos internos, como pulmões, fígado, trato gastrintestinal e rins - o que sugere uma distribuição hematógena do vírus no organismo destes animais (GEORGE, 1997). A presença do FP em órgãos internos pode resultar no comprometimento do funcionamento destes, por exemplo: tumores no pulmão causando alterações na flutuabilidade e na luz do intestino causando obstruções (GEORGE, 1997). Esses tumores são caracterizados como fibromas, fibrossarcomas de baixo grau de malignidade e mixofibromas (WORK; BALAZS, 1999).

Os tumores viscerais normalmente aparecem na fase final da doença e são diagnosticados na necropsia. Muitos destes consistem em fibroblastos bastante diferenciados, similares aos fibromas cutâneos (KANG et al., 2008).

Segundo Aguirre e Lutz (2004), aproximadamente 25 à 30% das tartarugas que apresentam tumores externos apresentam, também, tumores internos.

Histologicamente os fibropapilomas são caracterizados por hiperplasia epidermal papilar benigna sobre uma haste de estroma fibrovascular proliferativo. Carcinógenos

químicos, luz UV, vírus oncogênicos e parasitos metazoários são outros agentes conhecidos que causam lesões cutâneas proliferativas semelhantes em outras espécies (HERBST et al., 1995).

Baseado nas suas características histolológicas, esta doença tem sido dividida em três tipos de lesões proliferativas: papilomas cutâneos, fibromas e fibropapilomas.

As lesões são classificadas como papilomas cutâneos quando há somente uma proliferação do tecido epitelial e representa a fase inicial de desenvolvimento dos tumores. São classificados como fibromas quando há proliferação restrita do tecido conjuntivo subcutâneo e como fibropapilomas, onde observa-se a proliferação de ambos tecidos – indicando uma fase intermediária. (HERBST, 1994).

Células epiteliais nas lesões proliferativas podem apresentar degenerações com a presença de corpúsculos de inclusão intracelular eosinofílicos e o estroma fibrovascular tem fibroblastos bastante diferenciados e frequentemente apresenta infiltrado perivascular de células mononucleares (GREENBLAST et al., 2005).

3.5 CLASSIFICAÇÃO

Segundo Work e Balazs (1999), os fibropapilomas podem ser classificados de acordo com o seu tamanho: São classificados como "A" (quando possui tamanho menor que 1cm); "B" (quando possui tamanho entre 1 e 4 cm); "C" (quando possui tamanho maior que 4 cm até 10 cm) e "D" (quando maiores que 10 cm).

Ainda os autores, utilizando o padrão hematológico de diversas tartarugas-verdes que apresentavam diferentes quantidade e tamanho de fibropapilomatose, sugeriram uma classificação da severidade dos fibropapilomas, a saber:

Quadro 1. Escore do tumor

	Escore do tumor			
	0	1	2	3
Tamanho do tumor	Número de tumores			
A (<1cm)	0	1-5	>5	>5
B (1-4cm)	0	1-5	>5	>5
C (>4-10cm)	0	0	1-3	>4
D (>10cm)	0	0	0	>1

Fonte: WORK, BALAZS, 1999

O escore reflete a severidade do fibropapiloma nas tartarugas-verdes, sendo (0) não debilitada, (1) leve, (2) moderada e (3) bastante debilitada.

Foi observado um decréscimo progressivo nos valores de hematócrito, sólidos totais, linfócitos, basófilos, eosinófilos e leucócitos totais além de um aumento progressivo de heterófilos à medida que aumentava o escore do tumor. Os monócitos aumentaram progressivamente à medida para os valores de escore de tumor 2 e 3, não sendo observada diferença de monócitos nos escores 0 e 1. Assim, o escore do tumor pode estar relacionado com o status fisiológico das tartarugas marinhas que apresentam fibropapilomatose (WORK; BALAZS, 1999).

3.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico pode ser realizado clinicamente pela presença das massas tumorais, mas deve haver confirmação por análise histopatológica. Não existem testes para a detecção de infecções sub-clínicas ou latentes (HERBST et al., 1995).

3.7 QUADRO CLÍNICO

As tartarugas que encontram-se em um estágio avançado da doença apresentam fraqueza, anemia regenerativa, cegueira, diminuição progressiva da contagem de linfócitos, basófilos e eosinófilos e aumento progressivo de heterófilos e monócitos (MATUSHIMA et al., 2001; WORK; BALAZS, 1999).

21

Os animais acometidos também podem apresentar distúrbio na flutuação, caquexia,

hipoproteinemia, desbalanço eletrolítico, uremia e elevação de enzimas hepáticas (NORTON

et al., 1990). Contudo, pode ocorrer remissão das massas tumorais, bem como casos com

aumento de tamanho destas como também surgimento de novas formações (JACOBSON et

al., 1989)

O aumento da prevalência e o fato de que a fibropapilomatose é fatal em diversos

casos tem aumentado o interesse no possível impacto que a doença sobre o longo período de

vida da população das tartarugas-verdes, resultando em enforços para a identificação do

agente etiológico (HEBRST et al., 1995)

3.8 TRATAMENTO

Não existe um tratamento efetivo para a doença (GEORGE, 1997). A excisão dos

tumores com o animal anestesiado é o procedimento terapêutico recomendado para os casos

de fibropapilomatose em tartarugas marinhas (FUTEMA et al., 2004). A taxa de

sobrevivência de tartarugas-verdes após a cirurgia para retirada dos tumores está acima dos

90% (MATUSHIMA et al., 2009). Técnicas de criocirurgia também podem ser utilizadas para

a remoção dos tumores ao invés da excisão, pois a mesma pode estimular o sistema imune e

causar a regressão dos papilomas (GEORGE, 1997).

3.9 RELATO DE CASO

a) Paciente:

Chelonia mydas, CCC: 36cm, LC: 32,5cm, peso: 5,2kg

b) Data:

13/03/2010

Uma tartaruga marinha, da espécie Chelonia mydas, (Figura 1) foi resgatada pela

equipe de resgate do TAMAR-ICMBio base Ubatuba após notificação, realizada por um

pescador local, do encalhe na praia do Peres. Depois da constatação de que o animal

necessitava de cuidados clínicos, o mesmo foi encaminhado para o Setor Veterinário.



Figura 1. Paciente *C. mydas*, CCC: 36cm, LC: 32,5cm e peso: 5,2kg

c) Histórico

O animal chegou ao Setor Veterinário com histórico de ter sido capturado por rede de espera de superfície, com lesão causada por fio de náilon enroscado na nadadeira anterior direita (NAD), previamente retirado pelo pescador que a encontrou e presença de "fibropapiloma".

d) Exame clínico

O exame clínico revelou que o animal apresentava bom estado corpóreo, estrutura óssea sem alterações e reação normal à estímulos. Apresentava edema da NAD, e nela também uma lesão proximal ao redor de todo o membro, com destruição do tecido cutâneo e presença de cáseo – chegando a atingir a musculatura - em toda a área que estava em contato com o fio, garroteando o membro, além de pequenas lesões ulcerativas na face ventral da nadadeira. Após exame, observou-se a viabilidade da NAD, que apresentava resposta positiva ao estímulo de dor. Na nadadeira anterior esquerda (NAE), observou-se a presença de três fibropapilomas, sendo um "tipo B" - localizado na face ventral da inserção do membro - e outros dois distribuídos próximos à inserção do membro, sendo um "tipo A" - na face ventral - e um "tipo C" - localizado na face latero medial da nadadeira, tendo uma pequena porção da

sua estrutura nas faces dorsal e ventral da mesma, além de uma ferida em processo de cicatrização, também na inserção do membro (**Figura 2**).



Figura 2 - Avaliação do fibropapiloma em paciente *C. mydas* localizado na inserção da nadadeira anterior esquerda.

e) Diagnóstico

Edema da nadadeira anterior direita causada por interação com artefato de pesca – fio de náilon – e presença de três fibropapilomas na nadadeira anterior esquerda - um "tipo B" localizado na face ventral da inserção do membro; um "tipo C" também próximo à inserção do membro na face medial da nadadeira e um tipo "A", na face ventral.

f) <u>Tratamento</u>

Foi instituída terapia antimicrobiana com enrofloxacino (5mg/kg IM) cinco aplicações, com intervalo de 48 horas entre elas; terapia anti-inflamatória com flunixim meglumine (0,1mg/kg IM) três aplicações, SID; limpeza da ferida causada pelo náilon com utilização de própolis em solução alcoólica instilado sobre a ferida além da retirada dos fibropapilomas.

g) Cirurgia

Dezesseis dias após a chegada do animal, foi realizada a cirurgia para retirada dos fibropapilomas do paciente. O animal foi mantido em jejum, limpo e então encaminhado para a sala de procedimento cirúrgico. O paciente foi posicionado em decúbito dorsal com o auxílio de um suporte para estabilidade do mesmo na mesa cirúrgica. Foi então preparada uma solução de lidocaína 2% e água para injeção, com diluição 1:1. O anestésico foi diluído para uma administração mais segura, diminuindo assim o risco de uma sobredose que pudesse resultar em complicações anestésicas. A dose do fármaco utilizado foi de aproximadamente 0,1 mL para cada 1 cm de base de tumor. Após cerca de cinco minutos da administração da droga, os tumores foram pressionados para averiguação do efeito da anestesia e após esses teste, deu-se prosseguimento à cirurgia.

Os papilomas foram, um de cada vez, excisados com a utilização de bisturi elétrico, sendo retiradas as massas tumorais por completo e uma pequena margem de 0,5 cm segurança e, utilizando o cauterizador elétrico, foi realizada a cauterização das feridas cirúrgicas. Por fim, foi realizada a limpeza destas e instilada própolis em solução alcoólica em cada uma delas. O animal então foi recolocado na área para animais com fibropapiloma dentro de um tanque mantido sem água até o animal readiquirir os movimentos. Os tumores foram identificados, armazenados em saco plástico e congelados para posterior envio ao Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, onde são realizadas pesquisas sobre fibropapilomatose.

h) Pós operatório

A cicatrização das feridas cirúrgicas (**Figura 3**) foram acompanhadas juntamente com a limpeza e evolução da cicatrização da lesão na NAD. Depois de limpas, era instilada própolis em solução alcoólica em todas as lesões presentes.



Figura 3. NAE após 15 dias da excisão dos fibropapilomas

i) Reintrodução no habitat natural

Trinta e oito dias após a internação, o animal então foi reintroduzido ao habitat natural, na mesma praia onde foi encontrado.

j) Considerações

Os tumores foram inicialmente classificados segundo Work e Balazs (1999). Após o tratamento inicial do edema da NAD, foi realizada a cirurgia para a retirada dos fibropapilomas da NAE segundo técnica descrita por Futema e colaboradores (2004). Foi realizada técnica de anestesia local com cloridrato de lidocaína 2%, a qual permite relativa segurança (FUTEMA et al.,2004). Para diminuir possibilidade de risco de intoxicação na utilização da droga, a mesma foi diluida numa proporção de 1:1 em água de injeção. A própolis é usualmente utilizada como antimicrobiano e anti-inflamatório natural, pois possui propriedades antissépticas, antioxidantes e antimicrobianas que protegem vários sistemas orgânicos - inclusive a pele - onde atua promovendo migração de fibroblastos de forma mais rápida, levando à formação de um novo tecido conjuntivo, rico em colágeno (HOLLENBACH, 2004). A utilização da própolis foi utilizada por possuir baixo custo e ser eficiente em animais silvestres que apresentam lesões onde é requerida uma terapêutica suave.

4 CONCLUSÃO

A fibropapilomatose é uma doença de grande importância na preservação das tartarugas marinhas, principalmente da tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), espécie mais acometida pela doença. Ocorre principalmente em espécimes juvenis e adultas e pode levar estes animais à morte, pois pode dificultar a capacidade funcional dos membros do animal, bem como a visão, a respiração e a alimentação. Aliado à estes fatores, o aumento da prevalência desta doença vem sendo relatado em diferentes nações.

O conhecimento sobre esta doença é limitado. Ainda não se tem informações precisas sobre o agente etiológico, as vias de transmissão, em que fase da vida e de que maneira as tartarugas são acometidas pelo agente da FP – dados necessários para a compreensão da doença e também para que se possa pesquisar métodos de prevenção e tratamento adequados.

O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre a doença, sua possível etiopatogenia, a etiologia, os sinais clínicos, as lesões observadas, o diagnóstico, a evolução e o tratamento.

Ao longo da elaboração deste trabalho, observou-se a escassez de material sobre a doença no Brasil e também os esforços de pesquisadores de diversos países na definição do agente etiológico responsável pela fibropapilomatose. A partir da definição da etiologia, poderão ser desenvolvidos novos estudos e há a possibilidade de novos tratamentos serem descobertos, podendo auxiliar na preservação das tartarugas marinhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADNYANNA, W.; LADDS, P.W.; BLAIR, D. Observations of Fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*) in Indonesia. **Autralian Veterinary Journal**, Brunswich, v. 75, n. 10, p. 737-742, 1997.

ANDRADE, R. **Brasil: conservação marinha: nossos desafios e conquistas.** São Paulo: Empresa das artes, 2006, 171p.

AGUIRRE, A. A.; LIMPUS, C. L.; SPRAKER, T. R.; CHAVEZ-QUIROZ, A.; DU TOIT, L. A.; BALAZS, G. H. Histopathology of fibropapillomatosis in olive ridley turtles *Lepidochelys olivacea* nesting in Costa Rica. **Journal of Aquatic Animal Health,** Bethesda, v. 11, p. 282-284, 1999.

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

BALAZS, G.H. Synopsis of biological data on green turtle in the Hawaiian Islands. U.S. Department of Commerce, NOOA-TM-NMFS-SWFSC-7, Honolulu, Hawaii, 1980. 141 p.

BALAZS, G. H.; POOLEY, S.G. (Ed.). **Research plan for marine turtle fibropapilloma.** Honolulu: U.S. Department of Commerce, NOOA Technical memorandum, NMFS-SWFSC-156, 1991. 113 p.

BAPTISTOTTE, C. Caracterização espacial e temporal da fibropapilomatose em tartarugas marinhas da costa brasileira. **Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo**. Piracicaba, 63p, 2007.

BECKER, J. H. Biologia geral e comportamento das tartarugas marinhas. TAMAR-ICMBio, base Ubatuba, 2010. Palestra proferida em 02/03/20010.

BOWEN, B. W.; MEYLAN, A. 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 matricarchal phylogeny, **Evolution**, v. 46, n. 4, p. 865-881, 1992.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens.** Rio de Janeiro: Roca, 2007, 1354 p.

CURRY, S. S.; BROWN, D. R.; GASKIN, J. M.; JACOBSON, E. R.; EHRART, L. M.; BLAHAK, S.; HERNBST, L. H.; KELIN, P. A. Persistent Infectivity of a Disease-Associated Herpesvirus in Green Turtle after Exposure to Seawater. **Journal of Wildlife Disease**, v.36, p. 792-797, 2000.

- EHRART, L. M. Fibropapillomas in green turtles of the Indian River lagoon, Florida: Distribution over time and area, p.59-61. In: Balazs G.H. & Pooley S.G. (Eds), **Research Plan for Marine Turtle Fibropapilloma**. U.S. Department of Commerce, National Oceanographic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service. NOAA-TM-NMFS-SWFSC 156, 1991.
- ENE, A.; SU, M.; LEMAIRE,S.; ROSE, C.; SHARFF, S.; MORETTI.; LENZ,J.; HERBST, L.H. Distribution of chelonid fibropapillomatosis associated herpesvirus variants in Florida: molecular genetic evidence foi infection of turtles following recruitment to neritic developmental habitats. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n.2, p. 489-497, 2005.
- FOLEY, A.M.; SCHROEDER, B.A.; REDLOW, A.E., FICK-CHILD, K.J.; EAS, W.G. Fibropapillomatosis en stranded green turtles(*Chelonia mydas*) from the eastern united states (1980-98): trends and associations with environmental factors. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 41, n. 1, p. 29-41, 2005.
- FUTEMA, F.; WERNECK, M. R.; FONTENELLE, J. H., et. al. Anestesia epidural em tartarugas marinhas (*Chelonia mydas*) submetidas à excisão de papilomas. In: XIII Congresso e XIII Encontro da Associação Brasileira de Animais Selvagens. 2004, Jaboticabal. **Anais do XIII Congresso e XIII Encontro da Associação Brasileira de Animais Selvagens**, p. 73, 2004.
- GEORGE, R. H. Health problems and diseases of sea turtles. In: MUSICK, J. A.; LUTZ, P. L. **The biology of sea turtles.** New York: Science series, 1997. p. 364-375.
- GREENBLATT, R. J.; WORK, T. M.; BALAZS, G. H.; SUTTON, C. A.; CASEY, R. N.; CASEY, J. W. The *Ozobranchus* leech is a candidate mechanical vector for the fibropapilloma-associated turtle herpesvirus found latently infecting skin tumors on Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). **Virology**, 321, p. 101-110, 2004.
- GREENBLATT, R. J.; QUACKENBUSCH, S. L.; CASEY, R. N.; ROVNAK, J.; BALAZS, G. H.; WORK, T. M.; CASEY, J. W.; SUTTON, C. A. Genomic variation of the fibropapilloma-associated marine turtle herpesvirus across seven geographic areas and three host species. **Journal of virology**, v. 72 (2), p. 1125-1132, 2005.
- HARSHBARGER, J.C. Sea turtle fibropapilloma cases in the registry of tumors in lower animals. In: WORKSHOP RESEARCH PLAN FOR MARINE TURTLE FIBROPAPILLOMA, 1990, Honolulu: NOAA-TM-NMFS-SWFSC-156, 1991. p. 63-70.
- HERBST, L. H. Fibropapillomatosis of marine turtles. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 389-425, 1994.

- HERBST, L. H.; ENE, A.; SU, M.; DESALLE, R.; LENZ, J.; Tumor outbreaks in marine turtles are not due to recent herpesvirus mutations. **Current biology**, v.14, n. 17, p. 697-699, 2004
- HERBST, L. H.; GREINER, E. C.; EHRHART, L. M.; BAGLEY, D. A.; KLEIN, P. A. Serological association between spirorchidiasis, herpesvirus infection and fibropapillomatosis in green turtles from Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 3, p. 496-507, 1998.
- HERBST, L. H.; JACOBSON, E. R.; MORETTI, R.; BROWN, T.; SUNDBERG, J. P.; KLEIN, J. P. Experimental transmition of green turtle fibropapillomatosis using cells tumor extracts, **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 22, n. 1, p. 1-12, 1995.
- HERBST, L. H.; KLEIN P. A. Green turtle fibropapillomatosis: challenges to assessing the role of environmental cofactors. **Environmental Health Perspectives**, Washington, v. 103, suppl. 4, p. 27-30, 1995.
- HOLLENBACH, C. B.; ROSA, R. A. Utilização de estrato de própolis no tratamento de ferida aberta em bugio-ruivo (*Allouatta guariba clamitans*). In: XIII Congresso e XIII Encontro da Associação Brasileira de Animais Selvagens. 2004, Jaboticabal. **Anais do XIII Congresso e XIII Encontro da Associação Brasileira de Animais Selvagens**, p. 66, 2004.
- HUERTA, P.; PINEDA, H.; AGUIRRE, A.A.; SPRAKER, T.R.; SARTI, L.; BARRAGAN, A. First confirmed case of fibropapilloma in a leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). In: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 20., 2000, Orlando. NOAA-TM-NMFS-SWFSC-477, 2002. p. 193.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. *Chelonia mydas* (Green Turtle). Cambridge, 2010. Disponível em: http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/search>. Acesso em: 22 maio 2010.
- JACOBSON, E. R.; MANSELL, J. L.; SUNDBERG, J. P.; HAJAR, L.; REICHMANN, M. M.; EHRART, L. M.; WALSH, M.; MURRU, F. Cutaneous fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). **Journal Comparative Pathology**, v. 101, p. 39-52, 1989
- KANG, K. I.; TORRES-VELEZ, F. J.; ZHANG, J.; MOORE, P. A.; MORRE, P. D.; RIVERA, S.; BROWN, C. C. Localization of fibropapilloma-associated turtle herpesvirus in green turtle (Chelonia mydas) by in-situ hybridization. **Journal of Comparative Pathology**, v. 139, p. 218-225, 2008.
- MÁRQUEZ, M. R;. **FAO species catalogue.** Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. Fisheries Synopsis n. 125, v. 11 Rome, FAO. 1990. 81 p.

MEYLAN, A. B.; MEYLAN, P. A. Introducción a la evolución, historias de vida y Biologia de las Tortugas marinas. In: ECKERT, K. L.; BJORDNAL K. A.; ABREU-GLOBOIS, F. A.; DONNELLY, M. (Ed.). **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las Tortugas marinas.** Pennsylvania: Consolidated Grafic Communications, n. 4, 2000. p. 3-8.

MONEZI, T. A.; MULLER, N. M. G.; MATUSHIMA, E. R.; ROSSI, S.; RONDON, M.; MEHNERT,D. U. Detecção de herpesvirus 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. In:ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 16., 2006. São Pedro. **Anais...**, São Paulo: ABRAVAS, 2006, p.21

MUSICK, J. A.; LUTZ, P. L.; WYNEKEN, J. **The biology of sea turtles volume II** Florida: Science series, 2003, 472p.

NORTON, T. M.; JACOBSON, E. R.; SUNDBERG, J. P. Cutaneous fibropapillomas and renal myxofibroma in a Green Turtle, *Chelonia mydas*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, n.2, p. 265-270, 1990.

SMITH, G. M.; COATES, C. W. Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles *Chelonia mydas*. New York: **Zoologica**, v. 23, n. 4, p. 93-98, 1938.

WORK, T. M.; BALAZS, G. H. Relating Tumor Score to Hematology in Green Turtle with Fibropapillomatosis in Hawaii. **Journal of Wildlife Disease**, v. 35 (4) p. 804-807, 1999.