

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
DIRETORIA DE PESQUISA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**Influência da infecção por *Megalocytivirus pagrus1* no metabolismo de
tilápias e potencial de transmissão fecal**

Rafael Lopes Faria

Orientadora: Cláudia Maris Ferreira Mostério

São Paulo

Outubro - 2025

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
DIRETORIA DE PESQUISA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

Influência da infecção por *Megalocytivirus pagrus1* no metabolismo de tilápias e potencial de transmissão fecal

Rafael Lopes Faria

Orientadora: Cláudia Maris Ferreira Mostério

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Aquicultura e Pesca

São Paulo

Outubro - 2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca. Instituto de Pesca,
São Paulo

F236i Faria, Rafael Lopes

Influência da infecção por *Megalocytivirus pagrus 1* no metabolismo de tilápias e potencial de transmissão fecal

xi, 51f.; 8 fig.; tab. 2

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.

Orientadora: Cláudia Maris Ferreira Mostério

1. Aquicultura. 2. Aminoácidos. 3. ISKNV. 4. Metabolismo. 5. Fezes

I. Mostério, Cláudia Maris Ferreira II. Título.

CDD 574

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Influência da infecção por *Megalocytivirus pagrus*1 no metabolismo de tilápias e potencial de transmissão fecal

AUTOR(A): RAFAEL LOPES FARIA

ORIENTADOR(A): Claudia Maris Ferreira Mosterio


Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 CLAUDIA MARIS FERREIRA MOSTERIO
Data: 15/10/2025 16:57:30-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof(a). Dr(a) Claudia Maris Ferreira Mosterio



Prof(a). Dr(a) Antonio Mataresio Antonucci

Documento assinado digitalmente
 FERNANDA MENEZES FRANÇA
Data: 16/10/2025 11:00:03-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof(a). Dr(a) Fernanda Menezes França

Data da Realização: **10 de outubro de 2025, as 14:00**

Dedicatória

Este trabalho é em homenagem à toda minha família e amigos , que me apoiam, me incentivam e que sempre me mostram de tudo que sou capaz.

Obrigado

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio e incentivo de pessoas especiais, às quais sou imensamente grato.

Primeiramente à minha família, especialmente meu pai, minha mãe, minha avó e meu irmão, por sempre terem me apoiado em minhas decisões, me aconselhando sabiamente e me incentivando das maneiras mais afetuosas, pacíficas e zelosas possíveis. Se estou aqui hoje, é graças a todos eles. Meu amor por vocês é incondicional.

Ao meu teimoso “velhinho”. Meu amigo. Meu avô, que infelizmente não pôde presenciar o fim da minha jornada acadêmica e começo da jornada profissional, mas que sempre me ajudou em tudo que eu precisava, e que mesmo nos seus últimos brandos suspiros, se fez presente em me apoiar e ajudar. Tenho certeza que te dou muito orgulho. Eu te amo muito, e sinto sua falta.

À minha orientadora, Cláudia Maris Ferreira Mostério, por sua orientação paciente, dedicação e confiança ao longo de todo esses dois anos de pós-graduação. Sua escuta atenta, broncas, incentivos e conselhos são guias que sempre levarei em minha vida profissional, além de serem responsáveis por um crescimento e amadurecimento profissional e científico que jamais imaginaria ter. Obrigado.

Aos meus amigos da pós-graduação que faziam meus dias leves, felizes, alegres e vívidos. Passamos por muitos momentos de aflições, de discussões, de inseguranças e desafiadores, mas no final sempre exibíamos sorrisos verdadeiros de carinho e respeito, torcendo pelo sucesso um do outro. Luquinhas, Gui, Maria Rita, David, Carol e Giselle, os bons momentos com vocês no “toquinho” são memórias que guardarei com muito carinho. Obrigado.

A minha amiga, ou melhor, irmãzinha: Nathie. Seu ouvido foi pinico para as minhas reclamações, e os meus, para as suas. Obrigado por todos os conselhos, comidinhas e realities assistidos nos momentos de descontração. Sua amizade foi um ponto chave na minha vida. Obrigado.

Aos meus amigos de longa data, que me apoiaram de forma indireta.

Ao meu psicólogo, Cláudio, que simplesmente me ajudou a lidar com medos irreais que atrapalhavam meu crescimento e amadurecimento. Seu tom sereno e suas conversas afáveis me transformam todo dia. Obrigado.

Ao Instituto de Pesca, por fornecer infraestrutura e oportunidade de desenvolvimento do meu projeto.

Aos pesquisadores do Instituto de Pesca, que me aconselharam, me acolheram e me ensinaram muito.

Ao Conselho Nacional De Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo apoio financeiro. Fico grato em saber que pude agregar à ciência do nosso país.

A Dra. Márcia Catroxo pelo auxílio com a microscopia eletrônica.

Ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto Biológico, por auxílio na triagem bacteriana.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pela oportunidade de uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão, e seus excelentes profissionais.

E a mim. Que pude acompanhar esse processo de autoconhecimento, e que, apesar de todos os empecilhos e pessimismos da cabeça, consegui me fortalecer. Jamais achei que conseguiria fazer tudo que fiz, e chegar onde cheguei; e cá estou: prestes a finalizar mais uma etapa.

SUMÁRIO

Resumo Geral.....	x
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	13
2. Objetivo Geral.....	18
2.1. Objetivos Específicos.....	18
3.Referências.....	19
CAPÍTULO ÚNICO – Perfil de aminoácidos em duas espécies de tilápia e transmissão fecal do <i>Megalocytivirus pagrus1</i> (subtipo ISKNV)	
1. Introdução.....	26
2. Materiais e métodos.....	27
2.1. Experimento 1.....	27
2.1.1. Aquisição dos peixes e aclimação.....	27
2.1.2. Delineamento experimental e análise estatística.....	28
2.1.3. Preparo do inóculo.....	30
2.1.4. Coleta de sangue e tecidos.....	30
2.1.5. Análises moleculares.....	31
2.1.6. Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).....	31
2.1.7. Análise parasitológica.....	32
2.1.8. Isolamento e identificação bacteriológica.....	32
2.1.9. Microscopia Eletrônica de Transmissão (Contrastação Negativa)....	32
2.2. Experimento 2.....	33
2.2.1. Aquisição dos peixes, aclimação e adaptação.....	33
2.2.2. Delineamento experimental.....	33
2.2.3. Coleta de material fecal e qPCR.....	33
2.2.4. Infecção experimental.....	34
3. Resultados.....	34
3.1. Experimento 1.....	34
3.1.1. Aclimação e qPCR.....	34
3.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).....	35
3.1.3. Análise parasitológica.....	39
3.1.4 Triagem bacteriana.....	40

3.1.5. Microscopia eletrônica de Transmissão.....	41
3.2. Experimento 2.....	42
4. Discussão.....	43
5. Conclusão.....	46
6. Referências.....	46

RESUMO GERAL

A aquicultura se destaca como um dos setores de produção de alimentos que mais crescem no mundo, possuindo um papel fundamental na alimentação global. Entre as espécies cultivadas, as tilápias ocupam posição de destaque, em função de seu rápido crescimento e aceitação no mercado consumidor. A alta densidade no processo de cultivo e de sua produção, para suprir a demanda comercial, favorece a proliferação de patógenos. O *Vírus da Necrose Infecciosa do Baço e Rim (ISKNV)*, pertencente à família *Iridoviridae*, tem se destacado como uma das principais ameaças à tilapicultura, ocasionando elevadas taxas de mortalidade. No entanto, ainda são escassas as informações sobre as respostas metabólicas de diferentes espécies de tilápias frente à infecção por esse vírus, bem como sobre seu potencial de transmissão fecal. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo investigar ambos os aspectos. Foram conduzidos dois experimentos: o primeiro avaliou o perfil de aminoácidos em tilápias infectadas por ISKNV, e o segundo analisou a possibilidade de transmissão viral por meio das fezes. Para a interpretação dos dados, aplicou-se a Análise de Componentes Principais (PCA), a fim de explicar a variabilidade observada a partir de combinações lineares das variáveis originais. Os dois primeiros componentes explicaram 75% da variabilidade total, evidenciando alterações nas concentrações de arginina e lisina, ausentes nas amostras infectadas de ambas as espécies, o que sugere mobilização desses aminoácidos em resposta à infecção viral. Em contraste, observou-se aumento de valina nas amostras infectadas, possivelmente resultante da degradação de proteínas musculares em decorrência do estresse fisiológico ou de maior demanda energética. Além disso, verificou-se uma correlação inversa entre prolina e glicina, aparentemente independente da infecção, mas relacionada à espécie. Embora o vírus tenha sido eliminado por via fecal, essa rota não se mostrou propícia para transmissão nas condições avaliadas. Os resultados indicam que o ISKNV impacta diretamente o metabolismo de aminoácidos essenciais em tilápias, com potenciais repercussões sobre o desempenho zootécnico e a imunocompetência dos peixes.

Palavras-chave: Aquicultura; Aminoácidos; ISKNV; Metabolismo, Fezes.

ABSTRACT

Aquaculture stands out as one of the fastest growing food production sectors in the world, playing a key role in global food supply. Among the species farmed, tilapia occupy a prominent position due to their rapid growth and acceptance in the consumer market. The high density of the farming and production process, designed to meet commercial demand, favors the proliferation of pathogens. Infectious Splenic and Renal Necrosis Virus (ISKNV), belonging to the Iridoviridae family, has emerged as one of the main threats to tilapia farming, causing high mortality rates. However, there is still little information on the metabolic responses of different tilapia species to infection by this virus, as well as on its potential for fecal transmission. Given this, the present study aimed to investigate both aspects. Two experiments were conducted: the first evaluated the amino acid profile in ISKNV-infected tilapia, and the second analyzed the possibility of viral transmission through feces. For data interpretation, Principal Component Analysis (PCA) was applied to explain the variability observed from linear combinations of the original variables. The first two components explained 75% of the total variability, showing changes in arginine and lysine concentrations, absent in infected samples of both species, suggesting mobilization of these amino acids in response to viral infection. In contrast, an increase in valine was observed in infected samples, possibly resulting from the degradation of muscle proteins due to physiological stress or increased energy demand. In addition, an inverse correlation was found between proline and glycine, apparently independent of infection but related to species. Although the virus was eliminated via feces, this route was not conducive to transmission under the conditions evaluated. The results indicate that ISKNV directly impacts the metabolism of essential amino acids in tilapia, with potential repercussions on the zootechnical performance and immunocompetence of fish.

Keywords: Amino acids; ISKNV; Metabolism, Feces.

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

Aquicultura

A aquicultura é definida como um sistema de produção aquática de animais e plantas destinado majoritariamente ao comércio no mercado alimentício (Verdegem et al., 2023). Essa indústria alimentar se destaca como um dos setores que crescem vertiginosamente no cenário mundial, visto que entre 2000 e 2019, a sua produção apresentou um crescimento de 170%, passando de 20,8 para 56,3 milhões de toneladas, e em 2022 chegou ao total de 223,2 milhões de toneladas, incluindo tanto animais quanto algas (Verdegem et al., 2023; FAO, 2024). Segundo Wang & Lu (2016), as tilápias - nome dado a diversas espécies da família Cichlidae ocupam o segundo lugar de peixes mais cultivados mundialmente (perdendo apenas para as carpas) com uma produção que quadruplicou na última década, lhe garantindo uma notória importância na aquicultura.

Conforme relatado pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2024), o Brasil se destacou como o terceiro maior produtor de animais aquáticos da América, e o 13º do mundo. Segundo a Embrapa Pesca e Aquicultura (2023), a tilápia (*Oreochromis niloticus*), o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o camarão (*Caridea*), representam 81% do pescado produzido no Brasil. Desta porcentagem, 55% da produção é representada pela tilápia (Figura 1), indicando o favoritismo dessa carne no país.

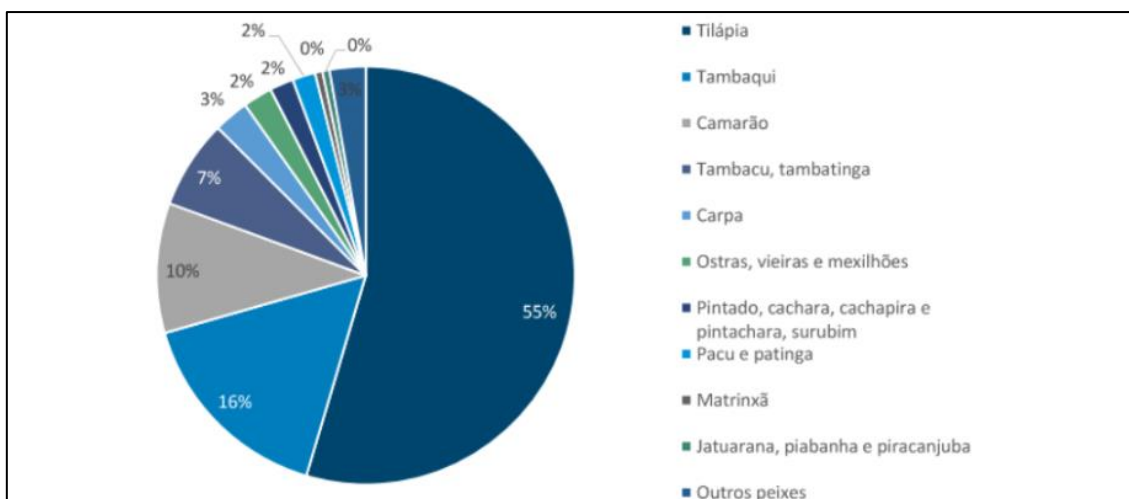


Figura 1 - Principais peixes produzidos para consumo no Brasil em 2020
Fonte: IBGE (2021).

Nativas do continente africano, a dispersão global das tilápias ocorreu principalmente no período pós-Segunda Guerra Mundial, impulsionada pelo investimento de países como China e Estados Unidos, que reconheceram o potencial dessas espécies

devido à sua notável capacidade de adaptação e reprodução, rápido crescimento e gosto pelo consumidor (Schulter & Filho, 2018; Simasiku et al., 2024). Cinco espécies de tilápias foram introduzidas em águas brasileiras, mas somente duas são comumente encontradas em pisciculturas comerciais ou de subsistência: a *Coptodon rendalli*, popularmente conhecida como tilápia rendalli, e a *Oreochromis niloticus*, conhecida como tilápia do Nilo (Fiuza, 2023; Ebert et al., 2024) (Figura 2). A primeira apresenta uma dieta predominantemente herbívora e uma coloração branda de verde-oliva, com o ventre geralmente avermelhado, enquanto a segunda possui um corpo tenuemente achatado, com listras verticais escuras e regulares na nadadeira caudal. Apesar da *C. rendalli* apresentar maior fecundidade do que a *O. niloticus*, a tilápia rendalli não possui a mesma taxa de crescimento que tilápia do Nilo, tornando esta última mais viável para a criação e comercialização (Moreira & Silva, 2023).



Figura 2 – Registros fotográficos da tilápia rendalli (A) e da tilápia do Nilo (B).

Fonte: Fishbase (2025) – adaptado.

Desde sua introdução no Brasil, ambas as espécies se dispersaram intencional e acidentalmente por lagos, rios e reservatórios do país (Novaes & Carvalho, 2011), o que, segundo Simberloff et al. (2013), os tornam uma ameaça para a biodiversidade local, não só através de interação e competição com espécies nativas, mas também pela transmissão de patógenos trazidos por estes animais exóticos.

Vírus da Necrose Infeciosa do Baço e Rim (ISKNV)

As doenças virais são os principais responsáveis pelas quedas nas produções de tilápias no mundo (Watkins & Bonomo, 2016). Pertencente ao gênero *Megalocytivirus* e à família *Iridoviridae*, o ISKNV é um vírus que acomete peixes de diversas espécies globalmente. A primeira detecção do ISKNV foi reportada por Inouye et al. (1992), que relataram que este patógeno se espalhou por parte do leste e do sudeste asiático, ocasionando perdas econômicas avassaladoras durante a década de 1990. Já no Brasil, o ISKNV assolou tilápias (*Oreochromis* spp.) em reservatórios em 2020, com uma taxa de mortalidade de até 75% em alevinos e juvenis no país (Figueiredo et al., 2022)

A suscetibilidade à doença causada pelo ISKNV depende da temperatura da água em que os animais estão expostos. He et al. (2002) demonstraram em seus estudos que a temperatura com maiores taxas de infecções e mortalidade ocorre em águas acima de 20°C. O patógeno pode ocorrer por coabitação com indivíduos contaminados e água contaminada; os métodos de diagnóstico usados são o PCR e suas variações para amplificação do material genético, e análise de regiões específicas do gene MCP (He et al., 2002; Chinchar et al., 2017). Entretanto, pouco se sabe sobre a transmissibilidade deste vírus através das fezes, tornando necessário o conhecimento desta via, uma vez que em criadouros esses organismos compartilham a mesma coluna de água.

Nutrição

Visando atender a alta demanda mercantil, as rações destinadas aos peixes são adicionadas com vitaminas, minerais e aminoácidos a fim de garantir que a ração forneça todos os nutrientes essenciais para a saúde dos peixes de criação. Junto a isso, essas moléculas desempenham um papel essencial no crescimento, proporcionando melhorias significativas no desenvolvimento dos peixes, permitindo que estes atinjam o tamanho comercial mais rapidamente (Brum et al., 2025).

Aminoácidos

As proteínas são formadas por aminoácidos que desempenham funções essenciais no metabolismo dos seres vivos. As tilápias demonstram uma eficiência no aproveitamento de carboidratos e gordura como fonte de energia, permitindo poupar proteínas para o uso fisiológico (Castro et al., 2014). Os aminoácidos essenciais para a tilápia são os mesmos para outros peixes: metionina, triptofano, arginina, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, treonina e valina (Ng & Romano, 2013).

Arginina

A arginina é um aminoácido essencial em peixes (Ng & Romano, 2013), sendo fundamental em reações fisiológicas relacionadas ao crescimento e saúde, e que pode ser obtida através de alimentação (Hoseini & Reverter, 2021). Sabe-se também que, segundo estudos de Jobgen et al. (2006), a arginina possui um papel fundamental como nutriente para a síntese de óxido-nítrico (NO), que está diretamente ligado a homeostase fisiológica (através da oxidação de glucose e ácidos graxos) e ao combate de patógenos, auxiliando na produção de óxido-nítrico em macrófagos, como descrito por Costas et al. (2013).

Lisina

Sendo considerada um dos principais aminoácidos limitantes – principalmente em rações de origem vegetal - a suplementação com lisina tem sido associada ao ganho de peso, melhora da conversão alimentar, maior retenção de nitrogênio, menor teor de lipídios nas escamas e melhor desempenho reprodutivo em peixes (Coldebella et al., 2011; Diemer et al., 2014). Prabu et al. (2019), Xiao et al. (2017) demonstraram que a lisina possui um notório protagonismo no crescimento muscular e nas respostas hematológicas e bioquímicas.

Yue et al. (2013) observaram que diferentes concentrações de lisina nas rações resultavam em respostas distintas à via de sinalização GH-IGF (reguladora do sistema imune inato em peixes), ao metabolismo de nutrientes e às respostas imunológicas, demonstrando que a lisina exerceu um efeito modificador no metabolismo lipídico e na resposta imune através da ativação da via de sinalização GH-IGF. Li et al. (2017) evidenciaram que a deficiência de lisina na dieta afeta positivamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias e negativamente a expressão de citocinas anti-inflamatórias.

Aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina)

Segundo Andersen et al. (2016), os aminoácidos de cadeia ramificada são fundamentais para a síntese proteica e para a regulação da degradação proteica e, ao contrário de outros aminoácidos, sua degradação ocorre antes de ser transferida para o fígado. Além disso, Han et al. (2014) mostraram que há uma interação entre eles, o que sugere uma interdependência nas quantidades necessárias e nas suas funções.

Não obstante, esses aminoácidos também atuam no sistema imunológico dos peixes. Segundo Hoseini & Reverter (2021) a isoleucina suplementada em níveis ótimos – quantidade máxima que pode ser usada favorecendo o máximo crescimento, sem causar prejuízo ao estado homeostático dos animais – auxilia no aumento do número de leucócitos. Zhao et al. (2013) demonstraram que a expressão dos genes pró-inflamatórios no rim cefálico desses peixes foi baixa, o que indica também que o nível ideal de isoleucina na dieta é necessário para aumentar a imunidade e a resistência a doenças. Luo et al. (2014) evidencia que o desequilíbrio da valina na dieta de peixes os tornam mais frágeis a inflamações e danos estruturais.

Prolina

A prolina é um aminoácido não-essencial - capaz de ser autossintetizado pelo animal - proteinogênico e hidrofóbico. Em peixes é originada da arginina, por meio da via de sinalização da arginase, que converte a arginina em prolina (Li et al., 2009). Segundo Li & Wu (2018), este aminoácido tem como função a regulação da expressão gênica e diferenciação celular, ativação da sinalização celular mTOR para iniciar a síntese de proteínas e eliminação de antioxidantes.

As tilápias, assim como outros peixes, não apresentam uma necessidade específica de proteínas, mas precisa de uma mistura bem equilibrada de aminoácidos indispensáveis (obtidos através da alimentação) e dispensáveis (sintetizados no organismo) (Shiau, 2002). Nguyen et al. (2020), mostraram que dietas em déficit de suplementação de ambas categorias de aminoácidos podem retardar e minimizar o crescimento do animal.

2. OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil de aminoácidos em duas diferentes espécies de tilápias (*O. niloticus* e *C. rendalli*) infectadas pelo *Megalocytivirus pagrus1* (ISKNV), e testar a capacidade de transmissão deste vírus por meio de excretas contaminadas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O estudo possui os seguintes objetivos específicos:

- Comparar o perfil de aminoácidos essenciais entre *O. niloticus* e *C. rendalli* após infecção experimental pelo ISKNV.
- Identificar os aminoácidos que apresentam alterações significativas frente à infecção viral, relacionando-os às possíveis respostas metabólicas e imunológicas dos peixes.
- Avaliar a presença e a carga viral do ISKNV em excretas de tilápias infectadas por meio de qPCR e microscopia eletrônica de transmissão.
- Determinar se a eliminação fecal do ISKNV representa uma rota eficiente de transmissão.

Segundo normas do Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca, esta dissertação está dividida em capítulo(s) que representa(m) artigo(s) científico(s) a ser(em) publicado(s) em revista(s) de seletiva política editorial. O capítulo único intitula-se “Perfil de aminoácidos em duas espécies de tilápia e transmissão fecal do *Megalocytivirus pagrus1* (subtipo ISKNV)”.

3. REFERÊNCIAS

- Andersen, S. M.; Waagbø, R. & Espe, M. (2016). Functional amino acids in fish health and welfare. *Frontiers in Bioscience (Elite edition)*, 8(1), 143–169. <https://doi.org/10.2741/757>.
- Brum, A.; Magnotti, C.; Tsuzuki, M. Y.; Sousa, E. M. O., Mouriño, J. L; P., Martins, M. L.; Lopes, R. G.; Derner, R. B. & Owatari, M. S. (2025). Pivotal roles of fish nutrition and feeding: Recent advances and future outlook for Brazilian fish farming. *Fishes*, 10(2), 47. <https://doi.org/10.3390/fishes10020047>
- Castro, C. S.; Ribeiro, R. R.; Agostinho, L. M.; Santos, A. A. D.; Carmelim, C. A.; Chan, R. V.; Neto, J. F. & Agostinho, C. A. (2014). Polyculture of frogs and tilapia in cages with high feeding rates. *Aquacultural Engineering*, 61, 43–48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02795.x>
- Chinchar, V. G.; Hick, P.; Ince, I. A.; Jancovich, J. K.; Marschang, R.; Qin, Q.; Subramaniam, K.; Waltzek, T. B.; Whittington, R.; Williams, T. & Zhang, Q. Y. (2017). Ictv report consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Iridoviridae. *Journal of General Virology*, 98(5): 890-891. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000818>
- Coldebella, I. J.; Radünz Neto, J.; Mallmann, C. A.; Veiverberg, C. A.; Bergamin, G. T.; Pedron, F. A., Ferreira, D. & Barcellos, L. J. G. (2011). The effects of different protein levels in the diet on reproductive indexes of *Rhamdia quelen* females. *Aquaculture*, 312(1): 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.021>
- Costas, B., Rego, P., Conceição, L., Dias, J. & Afonso, A. (2013). Dietary arginine supplementation decreases plasma cortisol levels and modulates immune mechanisms in chronically stressed turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture Nutrition*, 19(1), 25–33. <https://doi.org/10.1111/anu.12086>
- Diemer, O.; Bittencourt, F.; Barcellos, L. G.; Boscolo, W. R.; Feiden, A. & Romagosa, E. (2014). Lysine in the diet of *Rhamdia voulezi* male broodstocks confined in net cages. *Aquaculture*, 434: 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.07.029>
- Ebert, M. B., Narciso, R. B., Vieira Dias, D. H. M., Osaki-Pereira, M. M., Jorge, M., de León, G. P. & da Silva, R. J. (2024). Parasites (Monogenea) of tilapias *Oreochromis niloticus* and

Coptodon rendalli (Cichlidae) in a river spring in Brazil. *Parasite*, 31(22).
<https://doi.org/10.1051/parasite/2024021>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2024 The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. Retirado de: <https://www.fao.org/publications/home/fao-flagship-publications/the-state-of-world-fisheries-and-aquaculture/en>

Figueiredo, H. C. D.; Fernandes, J. B. K.; Martins, Y. S.; Gomide, A. T. M.; Freitas, L. A. & Silva, D. R. D. (2022). Identificação molecular do Iridovirus em tilápia-do-Nilo no estado de Goiás, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 73(6), 1339–1346.
<https://doi.org/10.1590/1678-4162-12790>

Fiuza, D. H. (2023). Um “rebanho” africano em águas brasileiras: história ambiental global da dispersão da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e *rendalli* (*Coptodon rendalli*) no Brasil. *REVHIST - Revista de História da UEG*, 12(2): 1-21.
<https://doi.org/10.31668/revistaueg.v12i2.13899>

Han, Y.; Han, R.; Koshio, S.; Ishikawa, M.; Yokoyama, S. & Gao, J. (2014). Interactive effects of dietary valine and leucine on two sizes of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 432: 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.022>

He, J. G.; Zeng, K.; Weng, S. P. & Chan, S. M. (2002). Experimental transmission, pathogenicity and physical–chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Aquaculture*, 204: 11–24. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00639-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00639-1)

Hoseini, S. M., & Reverter, M. (2021). Roles of arginine in fish nutrition and health: Insights for future researches. *Reviews in Aquaculture*, 13(4), 2091–2108.
<https://doi.org/10.1111/raq.12418>

Inouye, K.; Yamano, K.; Maeno, Y.; Nakajima, K.; Matsuoka, M.; Wada, Y. & Sorimachi, M. (1992). Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology*, 27(1), 19-27. <https://doi.org/10.3147/jsfp.27.19>

Jobgen, W. S.; Friedrich, G. L. & Wu, G. (2006). Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *The Journal of nutritional biochemistry*, 17(9), 571–588. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.12.001>

- Li, P. & Wu, G. (2018). Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth. *Amino Acids*, 50: 29–38. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2490-6>
- Li T.; Xiao-Qiu Z.; Wei-Dan J.; Yang L.; Pei W.; Jun J.; Sheng-Yao K.; Ling T.; Wu-Neng T.; Yong-An Z.; Fei X. & Lin F. (2017). Sodium butyrate improved intestinal immune function associated with NF- κ B and p38MAPK signalling pathways in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, 66: 548–563. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.049>
- Luo J-B; Feng L.; Jiang W-D; Liu Y.; Wu P.; Jiang J.; Kuang S-.; Tang L.; Zhang Y-A & Zhou X-Q. (2014). The impaired intestinal mucosal immune system by valine deficiency for young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is associated with decreasing immune status and regulating tight junction proteins transcript abundance in the intestine. *Fish Shellfish & Immunology*, 40: 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.003>
- Moreira, E. A. & Silva, D. P. (2023). Uma dúzia de peixes: algumas espécies exóticas invasoras encontradas em águas brasileiras e seus impactos. *Brazilian Animal Science*, v. 24. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v24e-74647E>
- Ng, W. K. & Romano, N. (2013). A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Reviews in Aquaculture*, 5(4): 220-254 <https://doi.org/10.1111/raq.12014>
- Nguyen, H.; Thinh V. D. & Hau D. C. (2020). Dietary replacement of fish meal by defatted and fermented soybean meals with taurine supplementation for pompano fish: effects on growth performance, nutrient digestibility, and biological parameters in a long-term feeding period. *Journal of Animal Science*, 98(12): 1-9. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa367>
- Novaes, J. L.C. & Carvalho, E. D. (2011). Artisanal fisheries in a Brazilian hypereutrophic reservoir: Barra Bonita Reservoir, Middle Tietê River. *Brazilian Journal of Biology*, 71(4), 821–832. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000400004>
- Prabu, E.; Felix, N.; Uma, A. & Praveenraj, J. (2019). Effects of dietary L-lysine supplementation on growth, body composition and muscle-growth-related gene expression with

an estimation of lysine requirement of GIFT tilapia. *Aquaculture Nutrition*, 26(2): 568–578. <https://doi.org/10.1111/anu.13018>

Schulter, E. P. & Vieira Filho, J. E. R. (2018). Desenvolvimento e potencial da tilapicultura no Brasil. *Revista de Economia e Agronegócio*, 16: 177–201. <https://doi.org/10.25070/rea.v16i2.554>

Shiau, S. Y. (2002). Tilapia, *Oreochromis* spp. In C. D. Webster & C. Lim (Eds.), *Nutrient requirements and feeding of aquaculture fish* (pp. 273–292). CAB International Publishers. <https://doi.org/10.1079/9780851995199.0273> . Acesso em: 27 de ago. 2025

Simasiku, E. K.; Hove, K.; Kanyeme, M. N.; Awala, S. K. & Matengu, K. M. (2024). *Comparative effect of fish feeds on the growth and survival rate of the Redbreast Tilapia (Coptodon rendalli) under intensive culture conditions* [Preprints.org.]. bioRxiv. <https://doi.org/10.20944/preprints202407.1808.v1>

Simberloff, D.; Martin, J.-L.; Genovesi, P.; Maris, V.; Wardle, D. A.; Aronson, J.; Courchamp, F.; Galil, B.; García-Berthou, E.; Pascal, M.; Pyšek, P.; Sousa, R.; Tabacchi, E. & Vilà, M. (2013). Impacts of biological invasions: What's what and the way forward. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(1), 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.07.013>

Verdegem, M.; Buschmann, A. H.; Latt, U. W.; Dalsgaard, A. J. T. & Lovatelli, A. (2023). The contribution of aquaculture systems to global aquaculture production. *Journal of the World Aquaculture Society*, 54(2), 206–250. <https://doi.org/10.1111/jwas.12963>

Wang, M. & Lu, M. (2016). Tilapia polyculture: A global review. *Aquaculture Research*, 47(8), 307–315. <https://doi.org/10.1111/are.12708>

Watkins, R. R. & Bonomo, R. A. (2016). Overview: Global and local impact of antibiotic resistance. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.001>

Xiao, W.; Li, D. Y.; Zhu, J. L.; Zou, Z. Y.; Yue, Y. R. & Yang, H. (2017). Dietary valine requirement of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition*, 24: 315–323. <https://doi.org/10.1111/anu.12562>

Yue, Y., Zou, Z., Zhu, J., Li, D., Wei, X., Han, J., & Yang, H. (2013). Effects of dietary arginine on growth performance, feed utilization, haematological parameters and non-specific immune responses of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture Research*, 46: 1801-1809. <https://doi.org/10.1111/are.12333>

Zhao, J.; Liu, Y.; Jiang, J.; Wu, P.; Jiang, W.; Li, S.; Tang, L.; Kuang, S.; Feng, L. & Zhou, X. (2013). Effects of dietary isoleucine on the immune response, antioxidant status and gene expression in the head kidney of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Fish & Shellfish Immunology*, 35(2), 572–580. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.033>.

CAPÍTULO ÚNICO

Perfil de aminoácidos em duas espécies de tilápia e transmissão fecal do *Megalocytivirus pagrus1* (subtipo ISKNV)

RESUMO

Com sabor atrativo para a população e sua dispersão global, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e a tilápia Rendalli (*Coptodon rendalli*) se tornaram pescados de intenso cultivo ao redor do mundo. Em criadouros comerciais, que muitas vezes utilizam altas densidades populacionais, a proliferação de patógenos por coabitação, água contaminada e excretas pode ser facilitada. O vírus da necrose infecciosa do baço e rim (ISKNV) é um patógeno causador de doença com sinais clínicos como letargia e melanose, podendo levar à morte de animais. Pouco se sabe sobre as diferentes respostas metabólicas de ambas as espécies frente à infecção do ISKNV e da capacidade de transmissão deste patógeno pelas fezes. Por essas razões, o objetivo deste estudo foi analisar ambas as questões supracitadas. Foram realizados dois experimentos: um para verificar o perfil de aminoácidos entre as espécies, quando infectadas pelo ISKNV, e outro para verificar o potencial de transmissão desse vírus através das fezes. Utilizou-se a Análise de Componentes Principais para explicar a variabilidade dos dados observados através de combinações lineares das variáveis originais. O resultado mostrou que 75% da variabilidade total é explicada pelos dois primeiros componentes, evidenciando alterações nas concentrações de arginina e lisina, que se tornaram ausentes quando ambas as espécies foram infectadas por este vírus, indicando que estes aminoácidos são mobilizados para combater o agente viral. Em contrapartida, houve aumento da valina nas amostras infectadas, que pode estar sendo liberada a partir da degradação de proteínas musculares como resposta ao estresse ou à demanda energética aumentada. A análise também revelou uma correlação inversa entre prolina e glicina, que parece ser independente da infecção e sim relacionada à espécie. Apesar do vírus ser eliminado por via fecal ele não se apresentou como rota eficiente de infecção nas condições testadas. Os achados deste estudo indicam que o ISKNV afeta diretamente o metabolismo de aminoácidos essenciais em tilápias, com potenciais implicações sobre o desempenho zootécnico e a imunocompetência desses animais.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*; *Coptodon Rendalli*; Vias de transmissão; Microscopia eletrônica; Metabolismo de aminoácidos.

1. INTRODUÇÃO

A tilápia Rendalli (*Coptodon rendalli*) foi a primeira a ser introduzida na década de 50 com a finalidade de povoar reservatórios de hidrelétricas no estado de São Paulo, enquanto a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi posteriormente incorporada como parte de um programa federal de combate à fome e expansão do mercado agrícola (Fiuza, 2023). Segundo Jere et al. (2021), há uma relação ontogênica divergente entre essas duas espécies. Neste estudo, estes autores observaram que, enquanto a tilápia do Nilo apresentava uma dieta mais generalista durante seu crescimento, a tilápia Rendalli demonstrava seletividade alimentar ao longo do seu desenvolvimento, consumindo diferentes tipos de alimento em distintas faixas etárias, o que indica uma variação ontogenética sutil na dieta. Esse comportamento permitiu que estas espécies, principalmente a tilápia do Nilo, se estabelecessem e ocupassem novos territórios, muitas vezes se sobressaindo às espécies nativas (Zengeya et al., 2015; Valenti et al., 2021).

Na escala produtiva, a composição das rações utilizadas para aquicultura é crucial para garantir o crescimento aliado ao bem-estar dos animais de criação. Peixes, assim como outros animais, são capazes de sintetizar proteínas a partir de aminoácidos fornecidos pela dieta e/ou derivados de precursores metabólicos; aqueles que são obrigatoriamente obtidos por meio da alimentação, devido à incapacidade do organismo de sintetizá-los, são tradicionalmente chamados de aminoácidos essenciais (Furuya et al., 2023). Esses compostos orgânicos são essenciais para reações metabólicas em organismos vivos e possuem estruturas variadas que lhes conferem diversas funções específicas no indivíduo (Buxbaum, 2007). A demanda nutricional de aminoácidos exigida pelas tilápias varia de acordo com as espécies, estágio de vida e configuração dos aminoácidos.

Assim, a crescente demanda pelo pescado tem impulsionado a intensificação dos sistemas de produção aquícola em larga escala e o cultivo de diversas espécies, mas, elevando muitas vezes o risco de surtos e da disseminação de doenças infecciosas (Midtlyng, 2016). Esse efeito é acentuado na aquicultura, pois os animais cultivados coexistem na mesma coluna d'água, compartilhando o ambiente e seus respectivos patógenos (Kibenge, 2019).

Dentre os microrganismos causadores de doenças, os vírus figuram entre as principais ameaças enfrentadas pela aquicultura (Valero & Cuesta, 2023). A escassez de medidas antivirais para tilápias favorece a propagação de enfermidades causadas por vírus, como o Vírus da Necrose Infecciosa do Baço e Rim (ISKNV), resultando em

impactos econômicos relevantes (FAO, 2024; WOA, 2024).

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, 2025), o ISKNV é um vírus pertencente ao gênero *Megalocyttivirus* e à família *Iridoviridae*. Esta família é dividida em duas subfamílias: *Alphairidovirinae*, que abrange os gêneros *Lymphocystivirus*, *Megalocyttivirus* e *Ranavirus*, e *Betairidovirinae*, composta por *Iridovirus*, *Chloriridovirus* e *Decapodiridovirus*. Dentro dos *Megalocyttivirus*, existem duas espécies reconhecidas: *lates1* e *pagrus1*, sendo esta última à qual o ISKNV está associado.

Xu et al. (2008), Kurita & Nakajima (2012) e Chinchar et al. (2017) mapearam a morfologia e o genoma desses vírus: possuem capsídeos icosaédricos que variam de 120 a 300 nm de diâmetro, e genoma constituído por DNA de dupla fita (dsDNA). Por ser um patógeno que se manifesta em diversas espécies dulcícolas e marinhas, observou-se que os principais sinais clínicos dessa doença incluem letargia, melanose, natação errática, anemia severa, petéquias nas brânquias e aumento do baço e dos rins (Subramaniam et al., 2012; WOA, 2024; Zhu et al., 2021), decorrentes da hipertrofia celular causada pela replicação viral no citoplasma dessas células (Wang et al., 2007; Tanaka et al., 2014). Não obstante, alguns estudos, como o de Subramaniam et al. (2016), evidenciam hipertrofia em células cardíacas, intestinais e hepáticas.

Além do transporte de alevinos infectados pelo comércio, outras formas de transmissão documentadas incluem a água contaminada, o consumo de alimentos ou tecidos infectados e a coabitação entre peixes (transmissão horizontal) (He et al., 2002; Go & Whittington, 2006). Entretanto, até o presente momento, poucos estudos acerca da transmissão vertical e por excretas contaminadas foram documentados, o que se soma à escassez de informações sobre a manifestação deste patógeno diante de diferentes condições de estresse e estados nutricionais.

Por estas razões, o objetivo deste estudo foi analisar o perfil de aminoácidos em duas diferentes espécies de tilápias (*O. niloticus* e *C. rendalli*) infectadas pelo ISKNV, e testar a capacidade de transmissão deste vírus através de excretas contaminadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Experimento 1

2.1.1 Aquisição dos peixes e aclimação

Toda a experimentação foi autorizada pelo comitê de ética animal do Instituto de

Pesca-CEUA-IP 005/2022. Utilizou-se 239 exemplares de alevinos de tilápias (175 da espécie *C. rendalli* e 64 *O. niloticus*) coletados em tanques escavados do Setor de Aquicultura da APTA Regional, sediado em Pindamonhangaba (SP). Os alevinos foram transportados até o laboratório multiusuário do Instituto de Pesca (SP) em sacos plásticos de 60 litros.

No laboratório, os animais foram aclimatados em três tanques de 100 litros, submergindo parcialmente os sacos em bombonas previamente preparadas. Após 20 minutos de aclimação, os peixes foram retirados dos sacos e transferidos diretamente para os tanques, abastecidos com água decolorada por pernoite, munidos de filtração e aeração 24h. A temperatura foi mantida constante a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 10 dias, e alimentação fornecida *ad libitum* duas vezes ao dia (com os seguintes níveis de garantia: 36% proteína bruta (min), 6,5% extrato etéreo (min), 6,0% fibra bruta (max), 14% matéria mineral (max), 3,5% cálcio (max), 6% fósforo (min), 2,08% arginina, 2,04 % lisina, 1,4% treonina, 0,4% triptofano, 0,7% metionina. Durante esse período, foram coletados aleatoriamente tecidos de baço e rim (órgãos-alvo) de 15% dos indivíduos, a fim de confirmar a ausência ou presença do ISKNV por qPCR. Além disso, os animais foram submetidos a salmoura a 1% (10g de sal/litro), por 15 minutos, para profilaxia contra microorganismos, e pesados, obtendo-se um peso médio de $11,45\text{g} \pm 2,7$.

2.1.2 Delineamento experimental e análise estatística

O presente estudo foi dividido em dois experimentos: um para verificar o perfil de aminoácidos entre as espécies, quando infectadas pelo ISKNV, e o segundo para verificar o potencial de transmissão desse vírus através das fezes.

O delineamento experimental do Experimento 1 consistiu em quatro tratamentos: Controle *rendalli* (CR), Controle *niloticus* (CN), Infectados *rendalli* (IR) e Infectados *niloticus* (IN). Cada tratamento foi composto por três réplicas. No início da experimentação os peixes do grupo controle foram transferidos diretamente dos tanques de aclimação para os aquários correspondentes. Já os animais do grupo infectados, após a inoculação, foram imediatamente transferidos para aquários abastecidos com água a 18°C (um aquário, para cada espécie), onde permaneceram por 6 horas, antes de serem transferidos para os aquários de experimentação. O objetivo foi promover estresse térmico para uma infecção mais eficiente (Figura 1).

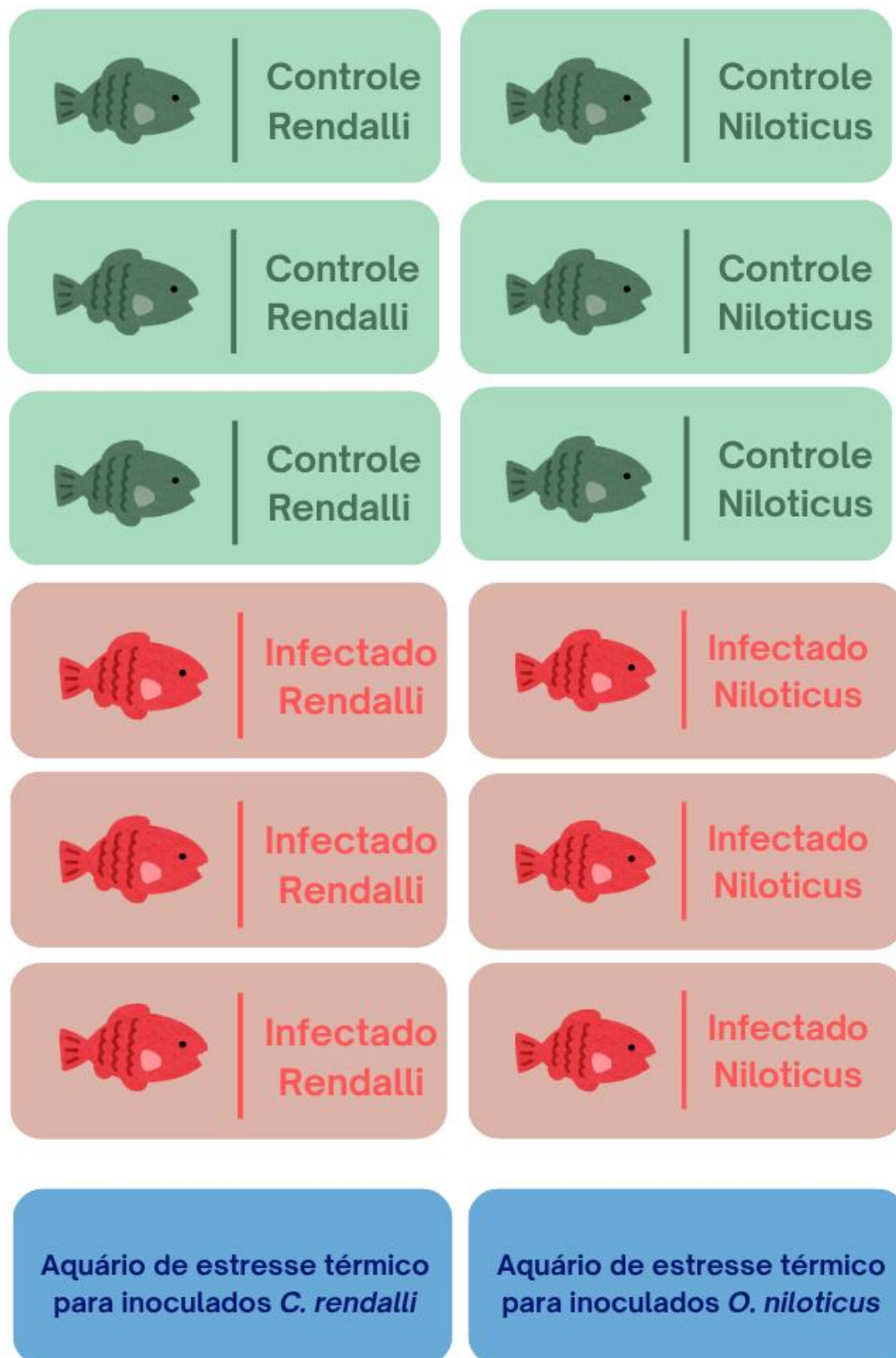


Figura 1 – Esquema do delineamento de inoculação experimental dos tratamentos para verificar o perfil de aminoácidos entre as espécies *Oreochromis niloticus* e *Coptodon rendalli* infectadas pelo *Megalocytivirus pagrus1* (subtipo ISKNV).

2.1.3 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, utilizou-se 25mg de tecido de duas amostras positivas para ISKNV com Ct(threshold cycle) de 24,1 e 24,6 para cada 500µL de tampão PBS (tampão fosfato-salino). No total, foram preparados 6mL de inóculo, utilizando 600mg de tecido. O preparo foi realizado em ambiente de fluxo laminar, onde os tecidos foram macerados lentamente em um cadinho, com adição de metade do volume total de PBS, até completa homogeneização do material. O homogenado obtido foi transferido para tubos de 10mL e centrifugado a $14.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente separado e transferido para novos tubos, sendo este utilizado como inóculo para a infecção experimental.

Iniciou-se o procedimento de inoculação dos peixes pelos tratamentos experimentais. Para isso, os animais foram insensibilizados, utilizando uma solução de 8mL de eugenol diluída em 50mL de álcool, adicionando 1mL dessa solução para cada litro de água. A inoculação foi feita via perfuração intraperitoneal, e em seguida os peixes foram submetidos ao estresse por temperatura a 18°C por seis horas e transferidos para seus respectivos aquários. Durante o período experimental que se estendeu por 14 dias, os animais foram alimentados *ad libitum* a partir do dia seguinte à inoculação com aeração mantida de forma contínua (24 h). Após esse intervalo, os animais foram anestesiados com eugenol para a coleta de sangue e eutanasiados por sedação profunda, conforme resolução CFMV nº 1000/2012, para a coleta de tecidos. Concomitantemente, coletou-se os resíduos fecais dos aquários para o Experimento 2.

2.1.4 Coleta de sangue e tecidos

A coleta de sangue foi realizada para obtenção de plasma sanguíneo e análise do seu perfil de aminoácidos através de cromatografia líquida. Foram coletados 1,5mL de sangue por pool, sendo cada pool composto por amostras de cinco peixes por aquário. Utilizou-se agulhas heparinizadas para obtenção do sangue por punção do vaso caudal, que foi centrifugado em uma mini centrífuga a $3.000 \times g$ por 10 minutos para a separação do plasma. O mesmo foi armazenado a -20°C até sua análise por cromatografia líquida. Sequencialmente, os peixes foram eutanasiados por sedação profunda. Em seguida, foi realizada uma incisão ventral entre as nadadeiras pélvicas e o ânus, permitindo a exposição das vísceras. Os órgãos-alvo, baço e rim, foram coletados em pool, seguindo a mesma ordem da coleta supracitada. Posteriormente foram identificados e armazenados a -20 °C até as análises.

2.1.5 Análises moleculares

Para a extração do DNA total dos tecidos, utilizou-se o Kit da Wizard® Genomic DNA Purification (A1120 Promega®). O procedimento foi realizado seguindo as instruções e protocolos do próprio kit. A viabilidade e qualidade do DNA foi conferida através do NanoDrop®.

Para o PCR em tempo real (qPCR), o DNA extraído foi diluído em água para obter uma concentração final de 10ng/μL. Em seguida, foi realizado um qPCR para confirmar a presença do vírus. Utilizou-se o kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega®) também seguindo instruções do fabricante. Para preparo da solução, utilizou-se 5μL de GoTaq® Master Mix, 0,25μL de sonda, 1,55μL de água livre de nuclease, 0,6μL de cada primer (forward e reverse) e 2μL de amostra, totalizando um volume final de 10μL. Para os primers e para a sonda utilizamos a sequência sugerida por Koda et al. (2023). O volume de cada componente foi ajustado considerando o número de amostras a serem analisadas, sendo posteriormente triplicado para garantir a realização em triplicata. Em seguida, foram dispensados 8μL da solução em cada poço de uma placa de 96 poços, adicionando depois 2μL de cada amostra com concentração de 10ng/μL. Nos três últimos poços, apenas a solução foi adicionada, sem amostras, para funcionar como controle. A placa foi selada e a amplificação foi realizada em um termociclador Applied Biosystems®, com a coleta dos valores de Ct para cada amostra. Os ciclos utilizados foram ajustados para uma concentração final de 10uL, com o primeiro estágio configurado para 95°C por 20 segundos e o segundo estágio com 40 ciclos divididos em duas fases, sendo a primeira a 95°C por três segundos e a segunda 60°C por 30 segundos.

2.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

Os aminoácidos analisados foram: Arginina, Lisina, Glicina, Isoleucina, Valina, Fenilalanina, Triptofano e Prolina. Utilizou-se o método proposto por Badawy e Morgan (2010) para a preparação da amostra e análise pelo HPLC. Adicionou-se 120μL do pool de plasma sanguíneo a 96μL de água ultrapura Milli-Q® e 24μL de ácido perclórico (HClO₄) e agitou-se por 10 segundos. Sequencialmente as amostras foram colocadas na geladeira por cinco minutos para decantação, e em seguida centrifugadas a 10.000 x g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado com seringa com filtro (Millipore®) de 45μm, e vinte microlitros foram utilizados.

A separação foi feita usando como fase móvel tampão de acetato de sódio 10mM

com água Milli-Q® (A) e acetonitrila (B) com o seguinte programa: 0-1 min (20% B); 1,01-1,5 min (5% de B); 1,51-8 min (4% B). A taxa de fluxo foi constante de 1 mL/min com picos detectados em 254nm. Todos os padrões foram diluídos em água Milli-Q® com 6% de HClO₄. Padrões foram avaliados por HPLC, montando curva padrão (software Clarity). As amostras foram avaliadas pelo pico e tempo de retenção. Após, os valores foram calculados pela curva padrão utilizando o software Clarity Chromatography®.

Para análise estatística usou-se uma Análise de Componentes Principais (PCA) que é uma ferramenta estatística de ordenação que ajuda na identificação das variáveis que mais contribuem para a variabilidade observada nos dados. A análise foi aplicada na modalidade de correlação, a qual realiza uma normalização dos dados antes dos cálculos.

2.1.7 Análise parasitológica

Para esta análise, a preparação do material foi realizada seguindo o Método de Hoffman, Pons & Janer (1933) adaptado por Barros et al. (2024). Amostras de fezes foram separadas, e em seguida homogeneizadas com água destilada. Essa mistura foi aplicada em um papel-filtro de 125mm, que estava inserido em um recipiente de fundo cônico. Após três horas, o material sedimentado no fundo do recipiente cônico foi coletado por pipeta Pasteur, misturado a uma gota de corante Lugol e observado à microscopia de luz. Uma lamínula foi depositada em cima da lâmina, garantindo espalhamento e melhor leitura da amostra. Seguidamente, observou-se as amostras nos aumentos 100x, 200x e 400x de magnificação.

2.1.8 Isolamento e identificação bacteriológica

Todo o procedimento foi realizado próximo a um bico de Bunsen, para evitar contaminação e manter a área ao redor esterilizada. Duas placas de meio previamente preparadas de ágar-sangue e ágar-Levine foram separadas para o processo de isolamento. Duas amostras de fezes foram separadas e homogeneizadas com PBS. Em seguida, cada placa foi dividida em dois quadrantes para as duas amostras de fezes infectadas. Em ambas as placas e quadrantes, aplicou-se uma gota da mistura das fezes com PBS. Em seguida, com uma alça de Drigalski esterilizada, espalhou-se homogeneamente as gotas da mistura nos quadrantes, garantindo o isolamento das colônias. Posteriormente, as placas foram levadas à estufa e mantidas a 34°C por 48 horas, para crescimento das colônias. Sequencialmente, as colônias foram identificadas pela técnica Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF).

2.1.9 Microscopia eletrônica de transmissão (contrastação negativa)

Amostras de fezes de pools do Experimento 1 que apresentaram menor Ct foram colhidas e armazenadas em microtubos de 1,5mL. Posteriormente, foram homogeneizadas com tampão fosfato-salino (PBS), e filtradas com filtro (Millipore®) de 45µm, removendo possíveis materiais indesejados e restando sujeiras fecais. A solução filtrada foi armazenada em criotubos e preparada para a microscopia eletrônica por contrastação negativa. Para isso, utilizou-se de uma grade de microscopia eletrônica revestida por carbono, previamente carregada eletrostaticamente. Aplicou-se 3µL de cada amostra em grades distintas e aguardou-se 60 segundos. Logo após, o excesso de amostra da grade foi retirado com um papel-filtro, aproximando-o paralelamente a grade de microscopia eletrônica, forçando o excesso da solução a passar para o papel por capilaridade. Em seguida, 3µL da solução de acetato de uranila 2% foram aplicados na grade, aguardando-se mais 30 segundos, repetindo o processo anterior, para retirar excesso dessa solução. Repetiram-se os dois últimos passos supracitados, seguindo da secagem total da grade, dessa forma seguindo diretamente para a microscopia eletrônica. O microscópio eletrônico de transmissão utilizado foi um JEOL JEM-1400 PLUS®.

2.2 Experimento 2

2.2.1 Aquisição dos peixes, aclimação e adaptação

Utilizou-se 180 alevinos de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) coletados de viveiros escavados de uma piscicultura comercial localizada em Registro (SP). Os animais foram transportados em sacos plásticos, com capacidade de 60L. No laboratório, os alevinos foram aclimatados e submetidos às mesmas condições de aclimação do experimento 1.

2.2.2 Delineamento experimental

No experimento 2 utilizou-se dois tratamentos com três réplicas simultâneas: controle (TC) e infectados (TI). A densidade de um 1,5 peixe por litro foi mantida e todos os sistemas contaram com aeração contínua. No tratamento controle (TC), os peixes foram mantidos em temperatura ambiente, sem exposição ao estresse térmico. Já no tratamento infectado (TI), os animais foram submetidos a estresse por baixa temperatura: 18 °C por 6h.

2.2.3 Coleta de material fecal e qPCR

Amostras fecais foram previamente obtidas de indivíduos do experimento 1 com infecção confirmada por ISKNV, por meio de qPCR. As fezes foram recolhidas

diretamente dos aquários utilizando uma pipeta Pasteur e agrupadas em pools para cada réplica. Posteriormente, foram secas em papel-filtro 125mm de diâmetro para absorção completa da água, preservando apenas o material fecal sólido para garantir acurácia no volume do material. As amostras secas foram então acondicionadas em microtubos estéreis apropriados e armazenadas a -80°C . Para a extração do DNA total das fezes e confirmação de infecção por qPCR foram usados os mesmos procedimentos aplicados no Experimento 1.

2.2.4 Infecção experimental

O conteúdo fecal total de três amostras positivas para ISKNV foi reunido, totalizando 3g de material. Este foi homogeneizado adicionando 12 mL de água, e 4mL desta mistura foram adicionados a cada réplica do (TI). A água dos aquários foi parcialmente (50%) renovada após 24 horas de exposição

3. RESULTADOS

3.1 Experimento 1

3.1.1 Aclimação e qPCR

Durante o período de aclimação houve sobrevivência de 89% dos animais e durante o período de 14 dias de experimentação registrou-se 37% de mortalidade dos organismos. Além disso, após qPCR, as amostras de tecido dos animais inoculados apresentaram valores de Ct positivos para ISKNV (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão de Ct (threshold cycle) obtidos por qPCR em amostras de DNA de baço e rim de *Oreochromis niloticus* e *Coptodon rendalli* sob diferentes condições experimentais (controle e infectado).

POOL	ESPÉCIE	TRATAMENTO	Ct*
1	<i>Coptodon rendalli</i>	Controle	Negativo
2	<i>Oreochromis niloticus</i>	Controle	Negativo
3	<i>Oreochromis niloticus</i>	Infectado	$34,9 \pm 0,7$
4	<i>Oreochromis niloticus</i>	Infectado	$28,9 \pm 0,6$
5	<i>Oreochromis niloticus</i>	Infectado	$32,6 \pm 0,6$
6	<i>Coptodon rendalli</i>	Infectado	$35,0 \pm 1,0$
7	<i>Coptodon rendalli</i>	Infectado	$28,4 \pm 1,2$

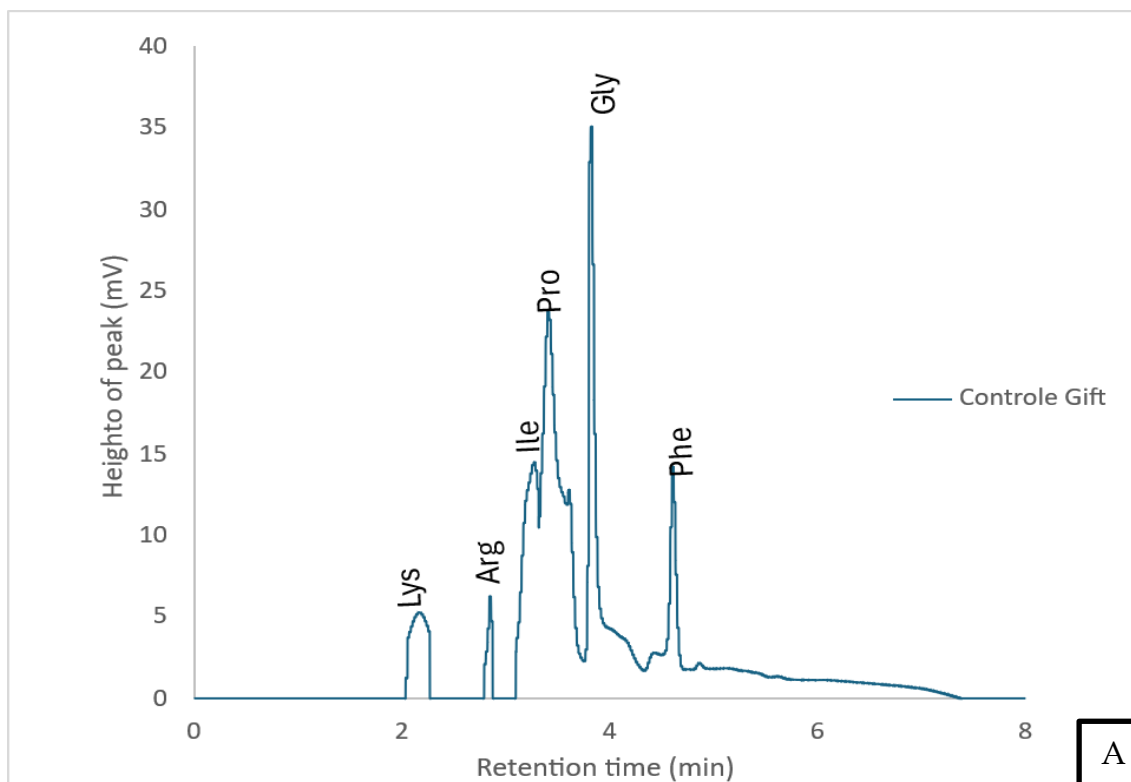
8	<i>Coptodon rendalli</i>	Infectado	27,3 ± 0,5
9	<i>Coptodon rendalli</i>	Infectado	34,6 ± 0,2

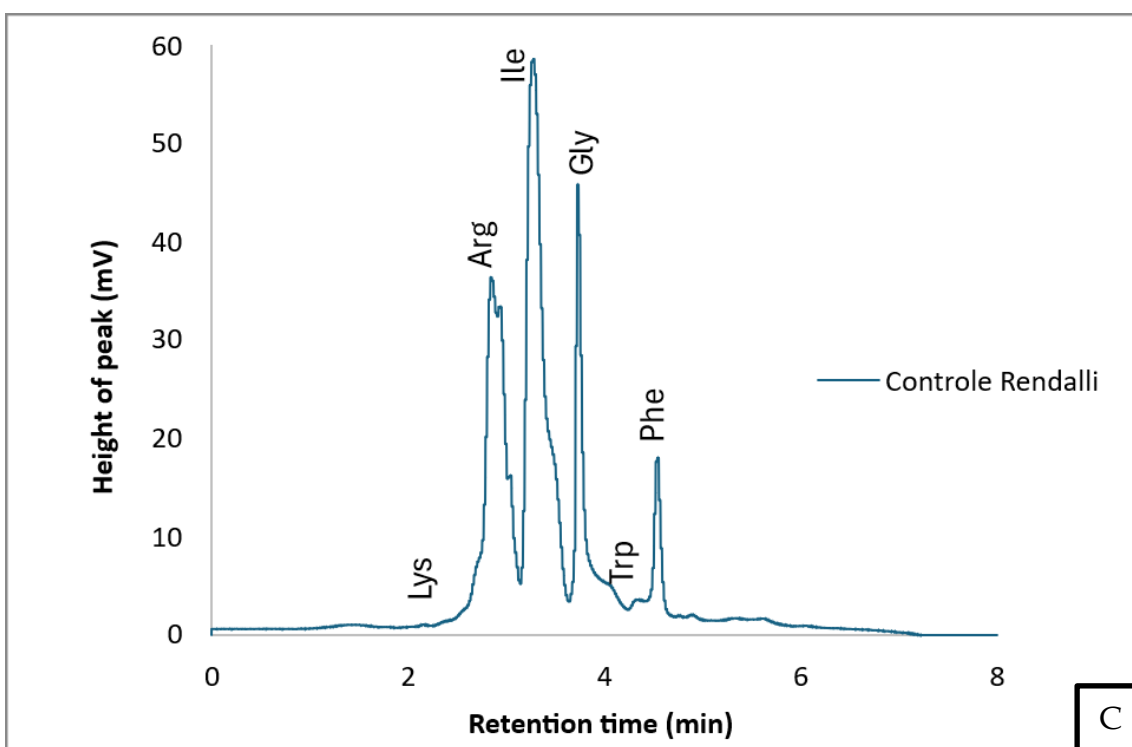
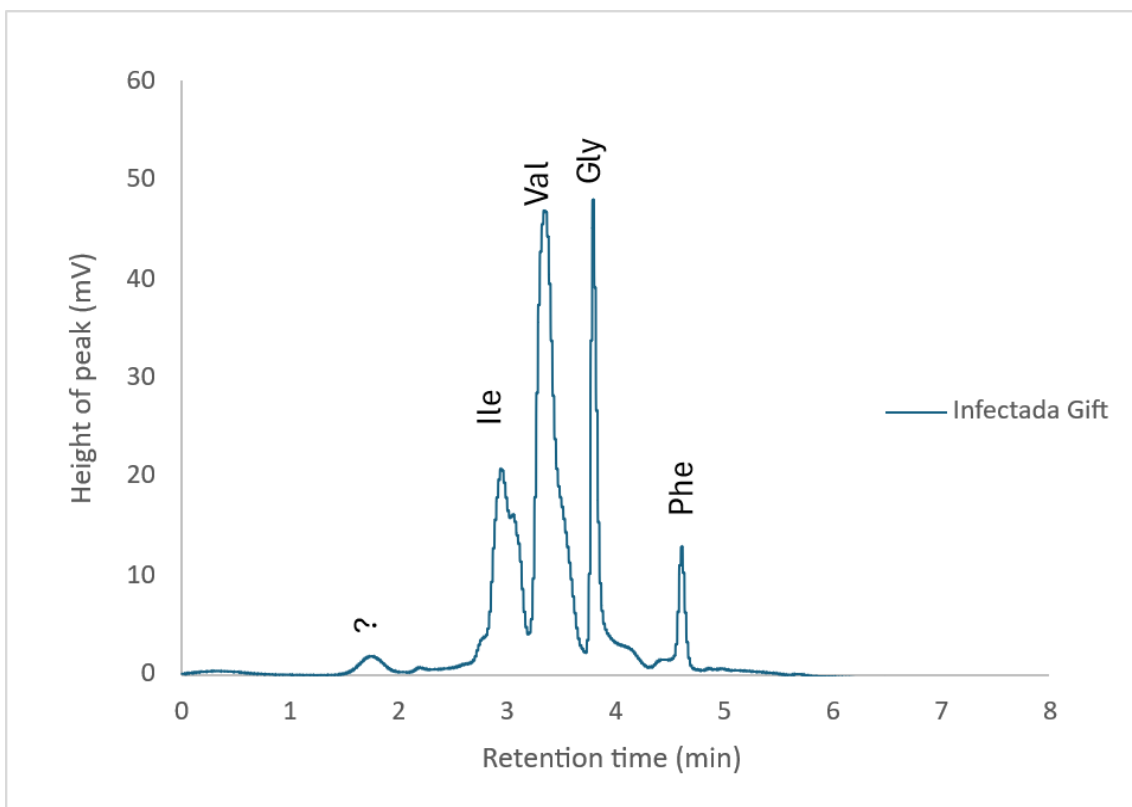
* As amostras (triplicata) foram consideradas positivas caso dois ou mais poços apresentassem Ct menor que 40, seguindo o protocolo de Koda et al. (2023).

Ambos os pools dos tratamentos controles evidenciaram um Ct indeterminado (*i.e.* negativo), indicando que o vírus foi indetectável nessas amostras. Os pools dos indivíduos infectados apresentaram-se todos positivos, com valores médios de Ct menor que 35, evidenciando a presença do patógeno nessas amostras.

3.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

A curva de pico da cromatografia líquida evidenciou diferentes valores de aminoácidos nas espécies e nos tratamentos (Figura 2).





C

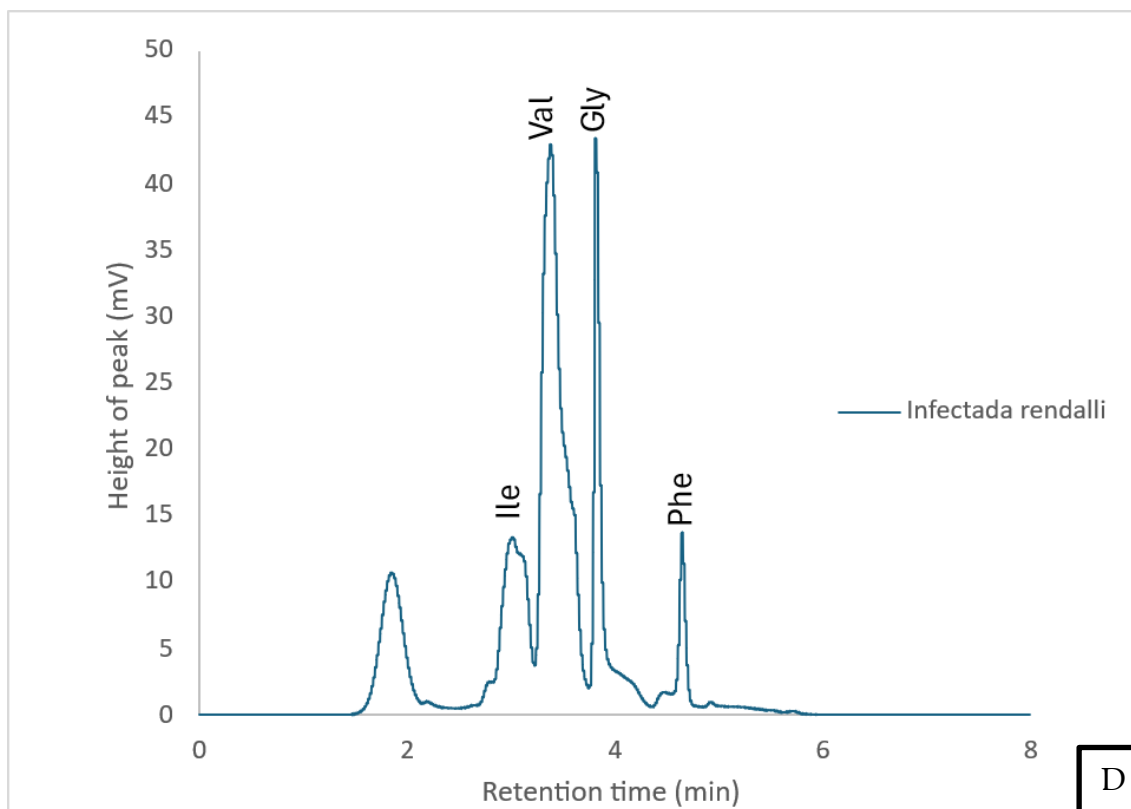


Figura 2 – Curvas de pico obtidas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), quantificando os aminoácidos das amostras de sangue coletadas. (A) Curva de pico do pool de amostras do tratamento controle da espécie *Oreochromis niloticus*; (B) Curva de pico do pool de amostras do tratamento infectado da espécie *Oreochromis niloticus*; (C) Curva de pico do pool de amostras do tratamento controle da espécie *Coptodon rendalli*; (D) Curva de pico do pool de amostras do tratamento infectado da espécie *Coptodon rendalli*.

A partir disso, obteve-se uma média de concentração de aminoácidos entre as amostras controle e infectadas e em relação as diferentes espécies (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração médias de aminoácidos (μM) no plasma sanguíneo colhido de duas espécies de tilápia (*Oreochromis niloticus* e *Coptodon rendalli*) em dois grupos experimentais (controle e infectadas) submetidos a inoculação viral pelo *Megalocytivirus pagrus1* (subtipo ISKNV)

aminoácidos (μM)	CONTROLE <i>Oreochromis niloticus</i>	CONTROLE <i>Coptodon rendalli</i>	INFECTADOS <i>Oreochromis niloticus</i>	INFECTADOS <i>Coptodon rendalli</i>
Arginina	$34,8 \pm 3,2$	$85,8 \pm 22,0$	-	-
Lisina	$56,4 \pm 2,9$	$35,5 \pm 1,7$	-	-
Glicina	$3467,5 \pm 386,5$	$4234,8 \pm 108,0$	$4055,6 \pm 345,5$	$4154,5 \pm 1467,0$
Isoleucina	$1582,2 \pm 236,4$	$2284,0 \pm 272,3$	$1598,2 \pm 247,6$	$1424,2 \pm 747,9$
Valina	-	-	$71,7 \pm 32,6$	$89,5 \pm 28,3$
Fenilalanina	$188,7 \pm 78,8$	$150,7 \pm 70,6$	$123,8 \pm 28,9$	$156,7 \pm 36,9$
Prolina	$43,2 \pm 7,0$	-	$44,6 \pm 0,1$	-

aminoácidos - Aminoácidos essenciais.

A Análise de Componentes Principais (Figura 3) evidenciou a ordenação dos aminoácidos nos diferentes tratamentos das amostras de ambas as espécies consideradas, com base nas concentrações medidas. O resultado mostrou que as duas primeiras componentes explicam 75% da variabilidade total dos dados. O componente 1 (41%) separa as amostras dos tratamentos “controle” e “infectado” das duas espécies. Neste eixo pode-se observar que a arginina e lisina estão associadas aos controles nas duas espécies e são inversamente proporcionais a valina, que por sua vez apresenta-se associada às tilápias infectadas. O componente 2 (34%) mostra uma correlação inversa entre prolina e glicina nas duas espécies, sendo que as amostras controle e infectadas da *rendalli* são caracterizadas por maiores valores de prolina e as *nilóticas* por glicina. A relação entre estes dois parece ocorrer independente da infecção e estar associada à espécie.

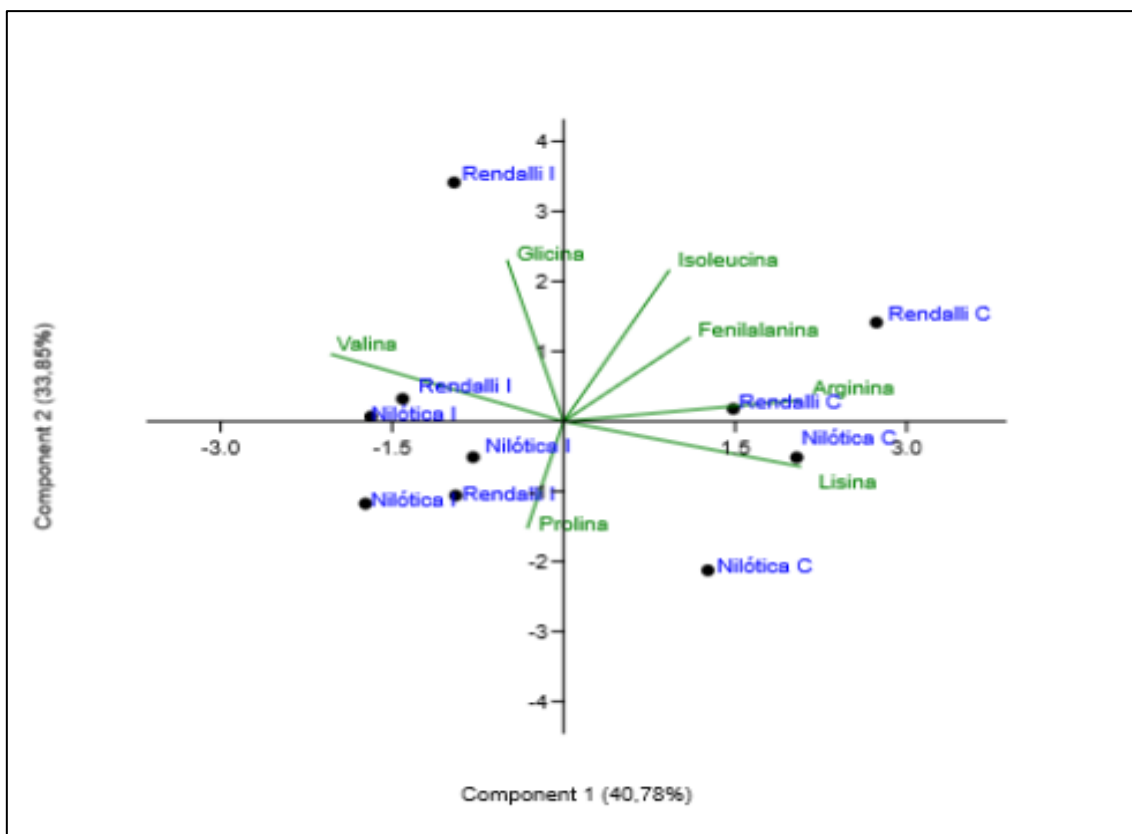


Figura 3 –Análise de Componentes Principais (PCA) mostrando a ordenação dos aminoácidos essenciais (Arg - Arginina, Lys - Lisina, Gly - Glicina, Ile - Isoleucina, Val - Valina, Phe- Fenilalanina e Pro - Prolina) no plasma sanguíneo de tilápias Rendalli (*Coptodon rendalli*) e nilótica (*Oreochromis niloticus*), infectadas pelo *Megalocytivirus pagrus1* (subtipo ISKNV).

3.1.3 Análise parasitológica

A observação em microscopia de luz evidenciou partículas ovais, sugerindo a possibilidade da presença de ovos e/ou oocistos de parasitas presentes nessas amostras, possivelmente em um estágio de desenvolvimento semelhante e sobrevivendo a mudanças de temperatura (congelamento e descongelamento) (Figura 4). Além disso, foram observadas algas e pequenas partículas circulares agrupadas.

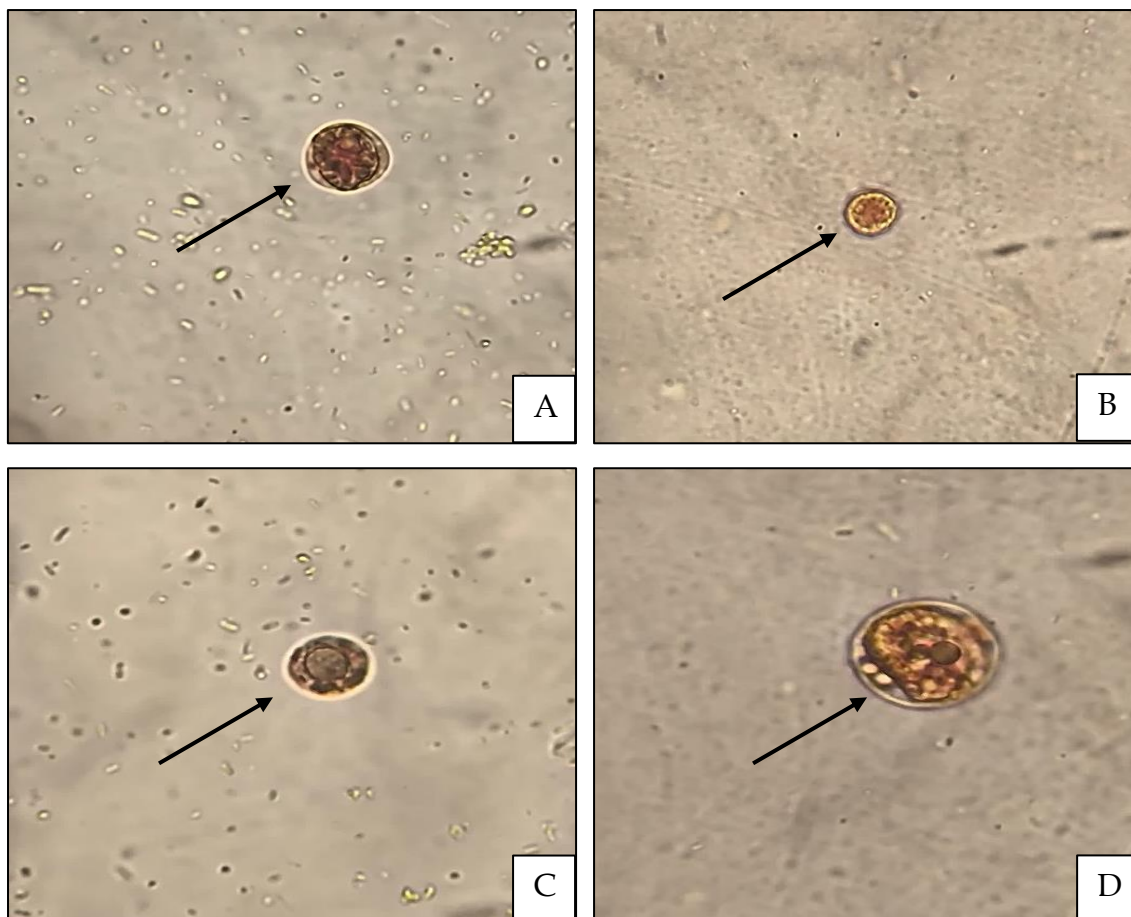


Figura 4 – Fotomicrografia de amostras de fezes coletadas dos aquários de indivíduos infectados por vírus da necrose infecciosa do baço e rim (ISKNV). A, B, C e D - Partículas sugestivas de ovos e/ou oocistos com padrões morfológicos e colorimétricos semelhantes, coradas com lugol. Aumento de 400x.

3.1.4 Triagem bacteriana

Após 24h na estufa, colônias de bactérias já haviam se estabelecido em ambos os meios de cultura. No meio Levine observou-se colônias com coloração rosada e de tamanhos variados. O meio ágar-sangue possibilitou crescimento de colônias grandes e pequenas de tonalidade cinza, colônias amarelas e uma colônia que realizou processo de hemólise (Figura 5).

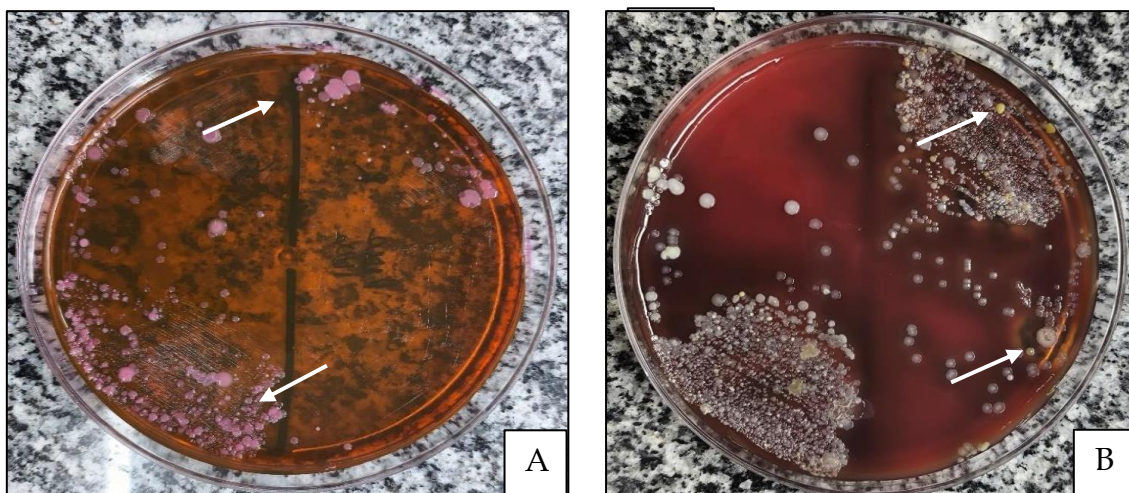


Figura 5 – Fotografia de meios de cultura Levine (A) e Ágar-Sangue (B). A - crescimento de colônias rosadas das espécies. B - Meio ágar-sangue, com colônias acinzentadas e amarelas (seta superior), e provável colônia de bactérias hemolíticas que realizaram hemólise (seta inferior).

Após espectrometria de massa MALDI-TOF as espécies identificadas no meio Levine foram *Acinetobacter ursingii* e *Chryseobacterium gambrini*. Já no meio ágar-sangue, as espécies identificadas foram: *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter modestus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Bacillus altitudinis* e *Rosellomorea marisflavi*.

3.1.5 Microscopia eletrônica de transmissão (contrastação negativa)

Na Figura 5 podem ser visualizadas as eletrofotomicrografias do conteúdo fecal das tilápias infectadas pelo ISKNV. A técnica de contrastação negativa evidenciou partículas virais sugestivas de ISKNV (formato icosaédrico, com tamanho aproximado entre 200-250nm, partículas virais sugestivas de paramyxovirus e a presença de imagens eletrodensas que representariam bactérias (Figura 6).

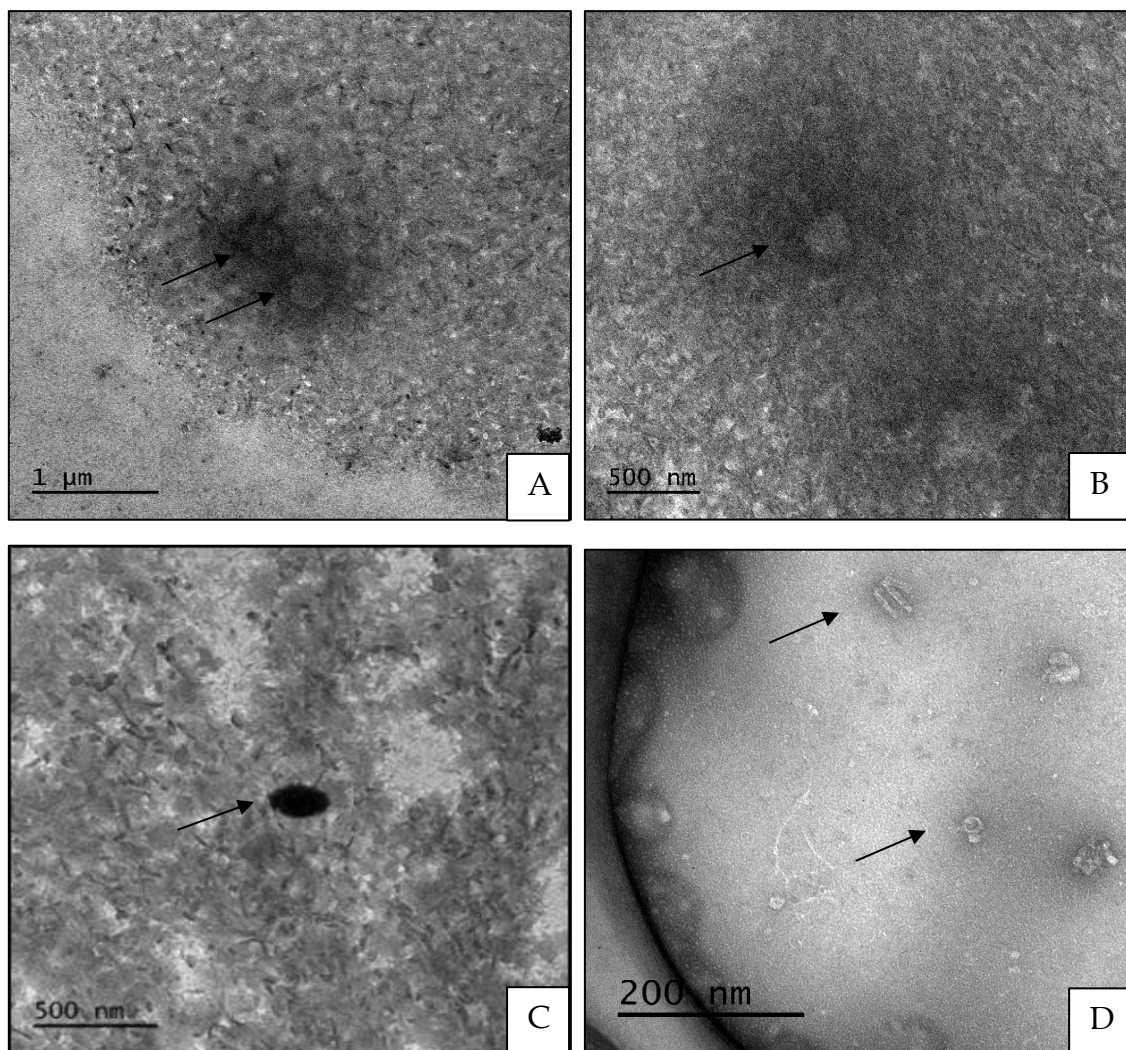


Figura 6 – Eletromicrografia de amostras de fezes de tilápias infectadas por *Megalocytivirus pagrus1* (subtipo ISKNV). Técnica de contrastação negativa. A e B - Partículas virais sugestivas de ISKNV. C - Imagem eletrodensa sugestiva de bactéria. D - Sugestiva partícula de paramyxovirus, em plano transversal.

3.2 Experimento 2

No experimento 2, registrou-se 5% de mortalidade no período de aclimação e 9% durante o período experimental (14 dias). As análises realizadas por qPCR dos tecidos coletados de peixes submetidos a infecção por solução de fezes contaminadas evidenciaram que 100% das amostras foram negativas indicando ausência do patógeno ou uma carga viral insuficiente para detecção pelo equipamento.

4. DISCUSSÃO

Casos de patologias bacterianas, parasitárias, fúngicas ou virais são frequentes em pisciculturas muitas vezes ocasionando perdas econômicas significativas (Midtlyng, 2016). Para minimizar estas perdas é fundamental o adequado manejo físico e alimentar destes animais. Um balanceamento adequado de carboidratos, proteínas, minerais e vitaminas é essencial para atender as demandas fisiológicas dos peixes. Diógenes et al. (2025) demonstraram que o déficit de qualquer um desses nutrientes pode causar prejuízos fisiológicos, perda de peso corporal, lesões, deficiências morfológicas e até morte, gerando perdas econômicas para as pisciculturas.

No presente estudo, verificamos que arginina e lisina ficaram abaixo do limite de detecção da técnica analítica utilizada, ou seja, ausentes no plasma de ambas as espécies (*O. niloticus* e *C. rendalli*) infectadas com ISKNV. Fujimoto et al. (2019) e Wu et al. (2009) reportam que a arginina é precursora da produção de óxido nítrico (NO), molécula com função microbicida e antiviral na imunidade inata de peixes. Esta via metabólica é um dos mecanismos de defesa contra patógenos intracelulares, como vírus. Não obstante, Hoseine et al. (2020) demonstraram que a arginina atua como um poderoso imunoestimulante em peixes, e que seu déficit reverbera negativamente no sistema imune, diminuindo a concentração de leucócitos. Inerente a isto, Costas et al. (2011) demonstraram que a arginina no sangue é reduzida em condições de estresse agudo e crônico em peixes, e que sua administração reduz o nível de cortisol no sangue. Além disso, Newsome et al. (2011) demonstraram que tanto a arginina quanto a prolina são capazes de serem biosintetizados pelo metabolismo do peixe sob demanda necessária, através da conversão da citrulina (um produto do ciclo de Krebs). Este mesmo estudo sugere que a prolina é condicionalmente indispensável para tilápias alimentadas com dietas deficientes em proteínas. Isso poderia justificar a queda da arginina nos tecidos ou plasma durante infecções, como observado nos peixes infectados com ISKNV.

Já a lisina participa da síntese proteica, modulação da expressão gênica e possível indução de resposta imune adaptativa (Ahmed & Ahmad, 2021). Santiago & Lovell (1988) já mostraram a importância da lisina e da arginina para o crescimento de tilápias, destacando a concentração percentual necessária na ração para atingir o desempenho máximo de crescimento e sua biosíntese. Neste sentido, é plausível propor que a depleção observada desses aminoácidos pode sugerir seu rápido consumo para atender à demanda metabólica gerada pela infecção viral, revelando uma resposta imunológica ativa, porém possivelmente limitada pelo aporte nutricional (Michelato et al., 2016; Vianna et al.,

2020). Por outro lado, carece na literatura estudos que analisam como a lisina se comporta frente a um patógeno em tilápias. Entretanto, Ahmed & Ahmad (2021) e Liaqat et al. (2025) demonstraram em suas publicações que este aminoácido também pode estar relacionado à resposta imunológica, dependendo da sua concentração ou correlação com outros aminoácidos.

Quanto a valina, a sua ausência nos tratamentos controle e a presença deste aminoácido no plasma dos peixes infectados sugerem que a infecção por ISKNV está associada à liberação de valina no sistema circulatório do peixe. Isso pode ocorrer a partir da degradação de proteínas musculares como resposta ao estresse, liberando esses aminoácidos de cadeia ramificada no sangue, aumentando suas concentrações (Luo et al., 2014).

Estes ciclídeos são suscetíveis a infecção por ISKNV, mas possuem diferenças relevantes em relação à dieta, comportamento alimentar e adaptação aos sistemas de criação. A espécie *C. rendalli* é principalmente herbívora, com forte preferência por macrófitas aquáticas, folhas, frutos, sementes e outros materiais vegetais. Já a *O. niloticus* é onívora com tendência herbívora, especialmente em sistemas naturais. Alimenta-se de fitoplâncton, perífíton, algas, detritos orgânicos e ocasionalmente de pequenos invertebrados aquáticos (Jere et al., 2021). No laboratório, sob condições experimentais ambas as espécies estavam sendo alimentadas com a mesma ração por mais de 45 dias e teoricamente apresentavam o mesmo estado nutricional basal. A espécie *C. rendalli* apresentou concentrações mais elevadas de alguns aminoácidos mesmo em condição infectada, sugerindo maior resistência fisiológica ou menor replicação viral. Entretanto, é possível sugerir que a ausência de prolina nas tilápias *rendalli*, pode estar relacionado diretamente à sua dieta e adaptação do seu trato digestório para uma dieta majoritariamente herbívora, limitando sua eficiência de degradação de aminoácidos em dietas não herbívoras. Contudo, mais estudos morfológicos são necessários para observar o comportamento digestivo de ambas as espécies, e suas possíveis singularidades.

Em geral, a carência destes aminoácidos pode comprometer a eficácia da resposta imunológica e impactar negativamente o estado nutricional, interferindo na capacidade de recuperação do hospedeiro. Este achado sugere a necessidade de investigações futuras sobre a suplementação específica desses aminoácidos como possível estratégia de suporte imunonutricional frente às infecções virais em tilapiculturas.

Em relação ao potencial de transmissão do ISKNV por via fecal, o presente estudo demonstrou que, apesar da detecção de partículas virais por qPCR, com morfologia

icosaédrica compatível com o ISKNV (ICTV, 2025) em amostras fecais por microscopia eletrônica de transmissão, não se observou transmissibilidade efetiva após a exposição dos peixes ao material contaminado. As análises por qPCR das tilápias submetidas à infecção via fezes não identificaram a presença do vírus nos tecidos (Experimento 2), o que sugere uma carga viral insuficiente para promover a infecção ou limitações à estabilidade e viabilidade viral neste meio. É possível que a estrutura das partículas virais tenha sido comprometida nas fezes, tornando-as não infectantes, ou que as condições ambientais e tempo de exposição tenham sido insuficientes para viabilizar a transmissão (revestimento mucoso intestinal, pH e microbiota intestinal, entre outros fatores.).

Evidentemente, diversas colônias de bactérias cresceram e puderam ser observadas. Após espectrometria de massa MALDI-TOF, as espécies identificadas no meio Levine são de *Acinetobacter ursingii* e *Chryseobacterium gambrini*. Já no meio ágar-sangue, as espécies identificadas foram: *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter modestus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Bacillus altitudinis* e *Rosellomorea marisflavi*. As espécies do gênero *Acinetobacter* já são conhecidas por serem patógenos oportunistas que causam infecções em peixes (Suneshine et al., 2007). Um estudo de Cao et al. (2018) demonstra que *Acinetobacter lwoffii* é emergente para ciprinídeos e cíclídeos na China, causando sinais clínicos como úlceras cutâneas, sangramento oral, inchaço hepático, e com potencial zoonótico. Entretanto, não foram encontradas publicações que abordam sua transmissão pelas fezes, já que esses organismos são documentados em lâminas histológicas do baço, do rim e do fígado. Além disso, Mwanza et al. (2021) demonstraram que *Chryseobacterium gambrini* possui potencial de infecção para peixes, e que expressa resistência a seis dos dez antibióticos testados em seu estudo.

Resumindo, a presença de partículas icosaédricas sugestivas de ISKNV na microscopia eletrônica de fezes de peixes infectados indica que o vírus é eliminado por essa via, mas não necessariamente em forma viável/infecciosa. A integridade da capsídeo e o ambiente fecal hostil podem prejudicar a capacidade de replicação após a eliminação. Entretanto, outros iridovírus, como o *Cyprinid herpesvirus* (CNGV), demonstraram transmissão fecal bem-sucedida (Dishon et al., 2005), o que justifica a importância de mais investigações sobre esta via para o ISKNV. O presente estudo, contudo, indica que em condições laboratoriais controladas, a via fecal não se apresentou como rota eficiente de infecção. Além disso, a presença do vírus em órgãos-alvo como baço e rim, e a ausência de positividade intestinal, reforçam o tropismo sistêmico do ISKNV (Xu et al., 2023; He et al., 2002).

Ainda assim, não se pode descartar completamente a possibilidade de transmissão fecal, especialmente em sistemas de cultivo intensivo com alta densidade e presença de biofilme, que podem favorecer a persistência viral. Vale ressaltar que Suebsing et al. (2016) detectou a presença de vírus do ISKNV em células foliculares dos ovários de tilápias, mostrando a possível capacidade de este vírus ser transmitido verticalmente. Entretanto, o estudo foi realizado através de fertilização *in vitro*, e a maior parte das infecções ocorreram posteriormente, em estágios de alevinagem. Estudos futuros devem considerar também o uso de fezes frescas, a avaliação da viabilidade viral neste meio, o uso de inóculos com maior concentração viral e tempo de exposição ampliado.

5. CONCLUSÃO

Concluindo, os achados deste estudo indicam que o *Megalocytivirus pagrus1* (subtipo ISKNV) afeta diretamente o metabolismo de aminoácidos em tilápias, com potenciais implicações sobre o desempenho zootécnico e a imunocompetência desses animais. Ademais, embora o vírus possa ser eliminado por via fecal, sua capacidade de transmissão por essa rota parece limitada, ao menos nas condições testadas. A plena compreensão integrada do estado nutricional, do perfil metabólico e das vias de transmissão é essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle sanitário na piscicultura moderna.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, I. & Ahmad, I. (2021). Dietary lysine modulates growth performance, haematobiochemical indices, non-specific immune response, intestinal enzymatic activities and antioxidant properties of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, 27(1): 124-139. <https://doi.org/10.1111/anu.13409>
- Buxbaum, E. (2007) *Fundamentals of protein structure and function*. (2° ed), pp. 521. Berlin: Springer, 2007. <https://ia800809.us.archive.org/7/items/FundamentalsOfProteinStructureAndFunction/Fundamentals%20of%20Protein%20Structure%20and%20Function.pdf>. Acesso em: 03 de setembro de 2025.
- Cao, S.; Geng, Y.; Yu, Z.; Deng, L.; Gan, W.; Wang, K.; Ou, Y.; Chen, D.; Huang, X.; Zuo, Z.; He, M.; & Lai, W. (2018). *Acinetobacter lwoffii*, an emerging pathogen for fish

in *Schizothorax* genus in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), 1391–1398. <https://doi.org/10.1111/tbed.12957>

Chinchar, V. G.; Hick, P.; Ince, I. A.; Jancovich, J. K.; Marschang, R.; Qin, Q.; Subramaniam, K.; Waltzek, T. B.; Whittington, R.; Williams, T. & Zhang, Q. Y. (2017). Ictv report consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Iridoviridae. *Journal of General Virology*, 98(5): 890-891. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000818>

Costas, B.; Conceição, L. E.; Dias, J.; Novoa, B.; Figueras, A. & Afonso, A. (2011). Dietary arginine and repeated handling increase disease resistance and modulate innate immune mechanisms of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). *Fish & Shellfish Immunology*, 31(4), 838–847. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.06.004>

Diógenes, A. F.; Fernandes, J. B. K.; Dorigam, J. C. P.; Sakomura, N. K.; Rodrigues, F. H. F.; Lima, B. T. M. & Gonçalves, F. H. (2015). Establishing the optimal essential amino acid ratios in juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by the deletion method. *Aquaculture Nutrition*, 22(2): 435-443. <https://doi.org/10.1111/anu.12262>

Dishon, A.; Perelberg, A.; Bishara-Shieban, J.; Ilouze, M.; Davidovich, M.; Werker, S.; Kotler, M. 2005. Detection of Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus in Fish Droppings. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11): 7285-7291. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7285-7291>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2024 The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. Retirado de: <https://www.fao.org/publications/home/fao-flagship-publications/the-state-of-world-fisheries-and-aquaculture/en>

Fiuza, D. H. (2023). Um “rebanho” africano em águas brasileiras: história ambiental global da dispersão da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e rendalli (*Coptodon rendalli*) no Brasil. *REVHIST - Revista de História da UEG*, 12(2): 1-21. <https://doi.org/10.31668/revistaueg.v12i2.13899>

Fujimoto, R. Y.; Santos, R. F. B.; Pala, G.; Gallani, S. U.; Valladão, G. M. R.; Morais, G. C.; Lee, J. T.; Sousa, N. C.; Cunha, F. S.; Maria, A. N.; Carneiro, P. C. F. & Pilarski, F. (2019). Supplementation with arginine in the diet of Nile tilapia reared in net cages.

Pesquisa Agropecuária Brasileira, 54: e01099. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.01099>

Furuya, W. M.; Cruz, T. P. & Gatlin, D. M. (2023). Amino acid requirements for Nile tilapia: an update. *Animals*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/ani13050900>

Go, J. & Whittington, R. (2006). Experimental transmission and virulence of a megalocytivirus (Family *Iridoviridae*) of dwarf gourami (*Colisa lalia*) from Asia in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) in Australia. *Aquaculture*, 258: 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.033>

He, J. G.; Zeng, K.; Weng, S. P. & Chan, S. M. (2002). Experimental transmission, pathogenicity and physical–chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Aquaculture*, 204: 11-24. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00639-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00639-1).

Hoseini, S. M.; Khan, M.; Yousefi, M. & Costas, B. (2020). Roles of arginine in fish nutrition and health: Insights for future researches. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), 2091–2108. <https://doi.org/10.1111/raq.12418>

International Committee On Taxonomy Of Viruses (Ictv). Taxonomy: *Megalocytivirus Pagrus1*. 2025. Disponível em: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?Taxnode_id=202303730&taxon_name=Megalocytivirus%20pagrus1 Acesso em: maio 2025.

Jere, A.; Jere, W.; Mtethiwa, A. & Kassam, D. (2021). Feeding interaction of exotic *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) versus native *Coptodon rendalli* (Boulenger, 1896) in the upper Kabompo River, northwest of Zambia. [Preprint]. bioRxiv. <https://doi.org/10.22541/au.165297962.28327439/v1>

Kibenge, F. S. B. (2019). Emerging viruses in aquaculture. *Current Opinion in Virology*, 34: 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.008>

Koda, S. A.; Subramaniam, K.; Hick, P. M.; Hall, E.; Waltzek, T. B. & Becker, J. A. (2023). Partial validation of a taqman quantitative polymerase chain reaction for the

detection of the three genotypes of infectious spleen and kidney necrosis virus. *Plos One*, 18(2): e0281292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281292>

Kurita, J. & Nakajima, K. (2012). Megalocytiviruses. *Viruses*, 4(4): 521-538. <https://doi.org/10.3390/v4040521>

Liaqat, R.; Fatima, S.; Komal, W. & Minahal, Q. (2025). Effects of dietary lysine, methionine, and tryptophan on regulating GH-IGF system and modulation of inflammatory and immune response in *Pangasius bocourti*. *Plos One*, 20(5): e0324549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0324549>

Luo J-B.; Feng L.; Jiang W-D.; Liu Y.; Wu P.; Jiang J.; Kuang S-Y., Tang L.; Zhang Y-A & Zhou X-Q. (2014). The impaired intestinal mucosal immune system by valine deficiency for young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is associated with decreasing immune status and regulating tight junction proteins transcript abundance in the intestine. *Fish Shellfish & Immunology*, 40: 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.003>

Michelato, M.; Vidal, L. V. O.; Xavier, T. O.; Moura, L. B.; Almeida, F. L. A.; Pedrosa, V. B.; Furuya, V. R. B. & Furuya, W. M. (2016). Dietary lysine requirement to enhance muscle development and fillet yield of finishing Nile tilapia. *Aquaculture*, 457: 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.022>

Midtlyng, P. J. (2016). Methods for measuring efficacy, safety and potency of fish vaccines. In: ADAMS, A. (ed.). *Fish vaccines*. Basel: Springer, 2016. pp. 119-141. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0980-1_6. Acesso em: 04 de junho de 2025.

Santiago, B. C. & Lovell, R. T. (1988). Amino acid requirements for growth of Nile tilapia. *The Journal of Nutrition*, 118(12): 1540-1546. <https://doi.org/10.1093/jn/118.12.1540>

Subramaniam, K.; Shariff, M.; Omar, A. R. & Bejo, M. H. (2012). Megalocytivirus infection in fish. *Reviews in Aquaculture*, 4: 221-233. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01075>

- Subramaniam, K.; Gotesman, M.; Smith, C. E.; Steckler, N. K.; Kelley, K. L. & Waltzek, T. B. (2016). Megalocytivirus infection in cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 119: 253-258. <https://doi.org/10.3354/dao02985>
- Suebsing, R.; Pradeep, P. J.; Jitrakorn, S.; Sirithammajak, S.; Kampera, J.; Turner, W. A.; Saksmerprome, V.; Withyachumnarnkul, B. & Kiatpathomchai, W. (2016). Detection of natural infection of infectious spleen and kidney necrosis virus in farmed tilapia by hydroxynaphthol blue-loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Applied Microbiology*, 121: 55-67. <https://doi.org/10.1111/jam.13165>
- Sunenshine, R. H.; Wright, M.-O.; Maragakis, L. L.; Harris, A. D.; Song, X.; Hebden, J.; Cosgrove, S. E.; Anderson, A.; Carnell, J.; Jernigan, D. B.; Kleinbaum, D. G.; Perl, T. M.; Standiford, H. C. & Srinivasan, A. (2007). *Multidrug-resistant Acinetobacter infection mortality rate*. *Emerging Infectious Diseases*, 13(1), 97–103. <https://doi.org/10.3201/eid1301.060716>
- Tanaka, N.; Izawa, T.; Kuwamura, M.; Higashiguchi, N.; Kezuka, C.; Kurata, O.; Wada, S. & Yamate, J. (2014). The first case of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) infection in aquarium-maintained mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in Japan. *Journal of Fish Diseases*, 37(4): 401-405. <https://doi.org/10.1111/jfd.12134>
- Valenti, W. C.; Barros, H. P.; Moraes-Valenti, P.; Bueno, G. W. & Cavalli, R. O. (2021). Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquaculture Reports*, 19: e100611. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>
- Valero, Y. & Cuesta, A. (2023). Reassortant viruses threatening fish aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 15: 1720-1731. <https://doi.org/10.1111/raq.12813>
- Vianna, R. A.; Chideroli, R. T.; Costa, A. R.; Filho, O. P. R.; Oliveira, L. L.; Donzele, J. J.; Lanna, E. A. T.; Gonçalves, D. D. & Pereira, U. P. (2020). Effect of experimental arginine supplementation on the growth, immunity and resistance of tilapia fingerlings to *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research*, 00: 1-8. <https://doi.org/10.1111/are.14478>

Wang, Y. Q.; Lü, L.; Weng, S. P.; Huang, J. N.; Chan, S. M. & He, J. G. (2007). Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis virus-like (ISKNV-like) virus. *Archives of Virology*, 152: 763-773. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0870-4>

World Organisation for Animal Health (WOAH). *Resolution No. 28: Amendments to the Aquatic Animal Health Code* [GS/91 – 2024/RES/28]. *Aquatic animal health code*. 2024. Disponível em: <https://www.woah.org/app/uploads/2024/05/gs91-2024-res-28-tech-aquatic-code-en.pdf>. Acesso em: 13 de maio de 2025

Wu, G.; Bazer, F. W.; Davis, T. A.; Li, P.; Rhoads, J. M.; Satterfield, M. C.; Smith, S. B.; Spencer, T. E. & Yin, Y. (2009). Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*, 37(1): 153-168. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0210-y>

Xu, X.; Zhang, L.; Weng, S.; Huang, Z.; Lan, D.; Zhong, X.; Yu, X.; Xu, A. & He, J. (2008). A zebrafish (*Danio rerio*) model of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) infection. *Virology*, 376(1): 1-12 <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.12.026>

Xu, Z.; Liao, J.; Zhang, D.; Liu, S.; Zhang, L.; Kang, S.; Xu, L.; Chen, H.; Peng, W. & Zhou, S. (2023). Isolation, characterization, and transcriptome analysis of an ISKNV-like virus from largemouth bass. *Viruses*, 15(398). <https://doi.org/10.3390/v15020398>

Zengeya, T. A.; Booth, A. J. & Chimimba, C. T. (2015). Broad niche overlap between invasive Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and indigenous congenics in Southern Africa: should we be concerned? *Entropy*, 17(7): 4959-4973. <https://doi.org/10.3390/e17074959>

Zhu, A.; Duan, C.; Li, Y.; Huang, C.; Weng, S.; He, J. & Dong, C. (2021). Pathogenicity and histopathology of infectious spleen and kidney necrosis virus genotype II (ISKNV-II) recovering from mass mortality of farmed Asian seabass, *Lates calcarifer*, in Southern China. *Aquaculture*, 534: e736326 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736326>