

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

**Estudo integrado de cultivo celular: replicação viral e técnicas de
esterilização**

Lucas Oliveira Desidera

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 - 2024

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

**Estudo integrado de cultivo celular: replicação viral e técnicas de
esterilização**

Lucas Oliveira Desidera

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 - 2024

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

D487E Desidera, Lucas Oliveira
Estudo integrado de cultivo celular: replicação viral e técnicas de esterilização
v, 63f.; fig 11.; tab. 1
Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca
do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.
Orientador: Cláudia Marias Ferreira Mostério

1. ISKNV. 2. Patógenos emergentes. 3. *Megalocytivirus pagrus* 1. 4. Irradiação. 5. Raios gama.
I. Mostério, Claudia Maris Ferreira II. Título.

CDD 578

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Estudo integrado de cultivo celular: replicação viral e técnicas de esterilização

AUTOR(A): LUCAS OLIVEIRA DESIDERA

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: 08/11/2024 11:53:01-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente



MARIANGELA MACCHIONE

Data: 10/11/2024 16:02:43-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prot(a). Dr(a) Mariangela Macchione

Documento assinado digitalmente



ULISSES DE PADUA PEREIRA

Data: 08/11/2024 17:43:09-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr(a) Ulisses de Padua Pereira

Documento assinado digitalmente



ALESSANDRA POPOV DOS SANTOS MANHA

Data: 18/11/2024 15:14:47-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr(a) Alessandra Popov dos Santos Manha

Documento assinado digitalmente



LIRIA HIROMI OKUDA

Data: 18/11/2024 21:32:47-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr(a) Liria Hiromi Okuda

Data da Realização: **31 de outubro de 2024, as 14:30**

Dedicatória

Este trabalho é em homenagem a todas as pessoas que estão envolvidas com pesquisa no Brasil e no mundo. Que ele seja útil para novos delineamentos e discussões sobre o tema.

Agradecimentos

Agradeço a todos as pessoas da minha vida que estiveram comigo durante esses dois anos.

A Dra. Cláudia Máris por todas as oportunidades e por todos os ensinamentos que levarei para o resto da vida.

Aos meus colegas do Instituto de Pesca por todos os ensinamentos e todos os momentos bons e ruins que passamos juntos: Guilherme, Rafael, Gabriela, Maria Rita, Carol, Vinícius, Marcos, Elionio e Luara.

Ao Dr. Ricardo Moro, pesquisadora Silvia e toda sua equipe do Laboratório Multiusuário de Microbiologia e Higiene Zootécnica da Universidade de São Paulo – Pirassununga.

A Dra. Márcia Catroxo por todo o auxílio com a parte de microscopia eletrônica.

As Dras. Eliana e Líria do laboratório de Bovídeos do Instituto Biológico pela ajuda com o cultivo celular.

Aos membros da banca tanto de qualificação quanto de defesa.

A minha família que me apoiou e me incentivou mesmo nos momentos mais difíceis.

A Graziella pelo incentivo que me deu durante esse período.

A todos os pesquisadores e funcionários do Instituto de Pesca que sempre tiveram paciência para ensinar e ajudar.

A todos os meus amigos por terem demonstrado tanto interesse no nosso trabalho e pelo carinho de todos

Sumário

Resumo Geral.....	vi
Abstract	vii
Introdução Geral.....	2
Referências Bibliográficas.....	10
CAPÍTULO 1	16
Resumo.....	17
1. Introdução.....	18
2. Material e Métodos	20
3. Resultados.....	25
4. Discussão.....	28
5. Agradecimentos	31
6. Referências Bibliográficas.....	31
CAPÍTULO 2	37
Resumo.....	38
1. Introdução.....	39
2. Material e Métodos	41
3. Resultados.....	42
4. Discussão.....	44
5. Agradecimentos	46
6. Referências Bibliográficas.....	46
7. Anexos.....	51

Resumo Geral

Com o aumento do número de patógenos emergentes em pisciculturas ao redor do mundo são necessários estudos investigativos para identificar suas características de patogenicidade e mecanismos de ação. Neste sentido, experimentos com isolamento viral em cultivo celular têm se tornado cada vez mais comuns. O cultivo celular consiste na manutenção de células vivas *in vitro*, e essa técnica vem ganhando relevância em linhas de pesquisas como caracterização viral e produção de vacinas. Esta dissertação foi composta por duas experimentações. Na primeira investigamos o comportamento do *Megalocytyivirus pagrus1* (genótipo ISKNV) em linhagem fibroblástica de peixe (BF-2), utilizando amostras de duas tilapiculturas localizadas em diferentes bacias hidrográficas no estado de São Paulo, Brasil. Após a confirmação da presença do patógeno por PCR convencional e qPCR, as amostras positivas foram sequenciadas e seguiram para isolamento. Utilizamos três amostras de cada piscicultura e realizamos três passagens para cada frasco inoculado. Confirmamos a presença do vírus nas células inoculadas por qPCR. Concluimos que a linhagem BF-2 é viável para o isolamento do ISKNV, porém não foi possível observar efeito citopático mesmo após 21 dias de inoculação. A segunda experimentação teve o objetivo de verificar a eficiência do tratamento por raios gama na esterilização de equipamentos não autoclaváveis usados em cultivos celulares. Comparamos o crescimento celular em garrafas sem uso e já usadas, mas esterilizadas por irradiação. Adicionalmente fizemos algumas inferências sobre o custo desse procedimento. O subcultivo foi realizado por três passagens consecutivas sem uso de antibiótico e antimicótico totalizando 12 dias. Concluimos que o método de irradiação por raios gama é eficiente para esterilizar garrafas plásticas previamente utilizadas em cultivo celular e que seu custo é competitivo financeiramente. O uso de materiais irradiados pode contribuir para a diminuição do passivo ambiental gerado pelos laboratórios de experimentação científica.

Palavras-chave: ISKNV, Patógenos emergentes, *Megalocytyivirus pagrus1*, Irradiação, Raios gama

Abstract

With the emergence of new pathogens in aquaculture worldwide, investigative studies are essential to identify their pathogenic characteristics and mechanisms of action. In this context, experiments involving viral isolation in cell culture have become increasingly common. Cell culture, which involves maintaining living cells *in vitro*, has gained prominence in research fields such as viral characterization and vaccine production. This dissertation comprises two experimental studies. The first investigates the behavior of *Megalocytivirus pagrus1* (genotype ISKNV) in a fish fibroblast cell line (BF-2) using samples from two tilapia farms located in different hydrographic basins in São Paulo, Brazil. After confirming the pathogen's presence through conventional PCR and qPCR, the positive samples were sequenced and prepared for isolation. Three samples from each farm were used, with three passages conducted for each inoculated flask. The virus's presence in the inoculated cells was confirmed through qPCR. While the BF-2 cell line was found to be suitable for isolating ISKNV, no cytopathic effects were observed, even after 21 days of inoculation. The second experiment aimed to assess the efficacy of gamma radiation treatment in sterilizing non-autoclavable equipment used in cell cultures. Cell growth was compared in unused flasks and previously used flasks sterilized via irradiation. Cost inferences were also made for this procedure. Subcultures were conducted over three consecutive passages without antibiotics or antifungal agents, spanning 12 days. The findings concluded that gamma radiation effectively sterilizes previously used plastic flasks for cell culture and is a financially competitive method. Utilizing irradiated materials may help reduce the environmental impact generated by scientific laboratories.

Key words: ISKNV, Emerging pathogens, *Megalocytivirus pagrus1*, Irradiation, Gamma rays

INTRODUÇÃO GERAL

Introdução Geral

Aquicultura

Devido ao contínuo crescimento da população mundial, a necessidade de se buscar novas formas de se produzir alimentos também cresce (Battersby, 2017). Dados da FAO (2023) mostram que houve um aumento na quantidade de pessoas em situação de fome no mundo, com um salto de 613 milhões de pessoas em 2019 para 735 milhões em 2023.

A aquicultura vem se mostrando uma boa possibilidade para ajudar a sanar esse problema, visto que em 2022 a produção de organismos aquáticos superou a produtividade da pesca se equiparando com outras formas de produções de alimentos em terra (Little et al., 2016; FAO, 2024). Essa atividade de produção em cativeiro de espécies aquáticas alivia o extrativismo intensivo de animais de água continental e marinha que coloca em risco a manutenção do equilíbrio ambiental e das relações interespecíficas desses ambientes (Little et al., 2016; Carneiro et al., 2022). Um exemplo da produção de organismos aquáticos são os tanques-rede possuindo alta densidade de animais (Figura 1). Esse estresse crônico acaba facilitando a proliferação de patógenos (Kibenge, 2016).



Figura 1. Tanque-rede de alta densidade em piscicultura no município de Ilha Solteira – São Paulo/Brasil. Foto de própria autoria.

Iridovirus e Megalocitivirus

Vírus emergentes vêm aparecendo em pisciculturas do mundo inteiro e causando grandes prejuízos e preocupações aos piscicultores e órgãos de fiscalização. Dentre esses organismos patogênicos estão os vírus da família *Iridoviridae* (Kibenge, 2019; WHO, 2020). Essa família é composta por 6 gêneros divididos em duas subfamílias: Alphairidovirinae (*Ranavirus*, *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus*) e Betairidovirinae (*Iridovirus*, *Chloriridovirus* e *Decapoiridovirus*).

Os vírus dessa família infectam principalmente insetos, crustáceos, anfíbios, répteis e peixes (Chinchar et al., 2017; ICTV, 2024). *Megalocytivirus* é um gênero que causa altas taxas de mortalidade e perdas econômicas em diversas propriedades que trabalham com a cultura de organismos aquáticos (Ramírez-Paredes et al. 2021; Fusianto et al. 2021). A primeira patologia causada por megalocitivirus em organismos aquáticos foi descrita por Inouye et al. (1992) no Japão. Após análise genética de sua proteína de capsídeo principal (MCP) o vírus foi batizado como Red sea bream vírus (RSIV). He et al. (2001) foi o primeiro a caracterizar e sequenciar outro gênero chamado de vírus da necrose infecciosa de baço e rim (ISKNV).

Em 2024, houve uma proposta para os órgãos competentes de alteração de nomenclatura desse vírus. Sugeriu-se o formato binomial utilizando o nome do gênero ao qual a espécie pertence e do organismo em que o vírus foi inicialmente encontrado. Desse modo, o ISKNV é agora um dos genótipos do *Megalocytivirus pagrus1* (ICTV, 2024; World Organisation of Animal Health; 2024).

Assim como outros grupos desta família, o *Megalocytivirus pagrus1* possui seu genotípico baseado na sequência do gene codificante da proteína do capsídeo principal (MCP) que é altamente conservada (Song et al., 2008). Com base nas similaridades filogenéticas principalmente entre os MCP's, os megalocitivirus são divididos em três genótipos diferentes: Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus (ISKNV), Red Seabream Iridovirus (RSIV) (Subramaniam et al., 2012; Go et al., 2016) e Turbot reddish body Iridovirus

(TRBIV) com diferenças significativas em seus códigos genéticos (Shi et al., 2010; Shuang et al., 2013). Os genótipos também são separados em dois clados diferentes com alta similaridade de genes conservados entre eles (Kurita e Nakajima, 2012; Fusianto et al., 2023; Qin et al., 2023).

O ISKNV pode ser detectável através de diversos sinais clínicos como ascite, endo e exoftalmia, letargia, palidez branquial, escurecimento da pele e estresse respiratório. Além disso, após realizada necrópsia é possível observar necrose de rim e baço. Alguns desses sinais podem ser observados na Figura 2.

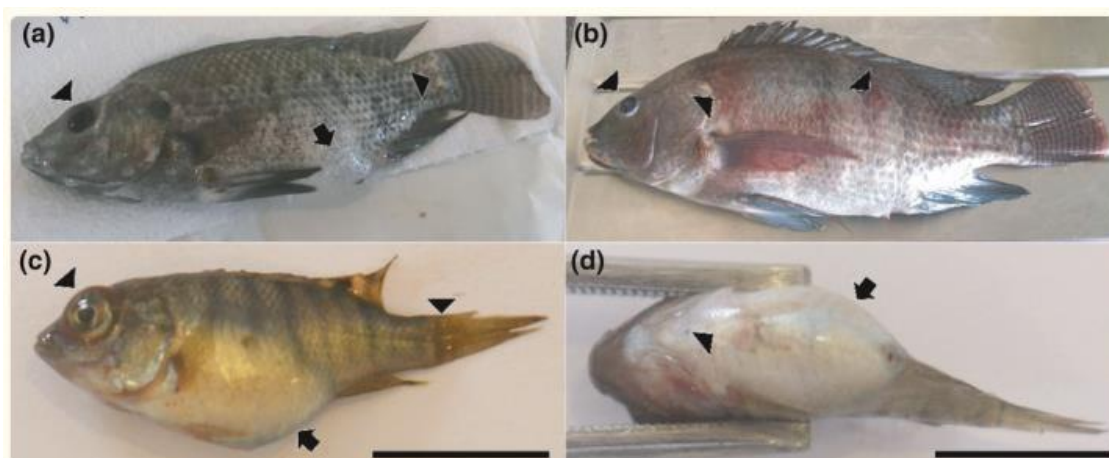


Figura 2. Peixes com sinais clínicos de ISKNV no Lago Volta, Ghana. Os sinais estão sinalizados pelas setas pretas e descritos em ordem da esquerda para direita. (a) Endoftalmia, ascite e abscesso. (b) Microftalmia, hemorragias e úlceras na pele. (c) Exoftalmia, ascite e perda de escamas e muco na pele. (d) Hemorragia e ascite severa. Fonte: Ramírez-Paredes et al. (2021) - adaptado.

Cultivo Celular

As técnicas de cultivo celular consistem na manutenção de células provenientes de algum organismo *in vitro*. As células em cultivo são suplementadas por uma diversidade de moléculas necessárias para sua replicação e mantidas em temperaturas específicas para cada linhagem. Essas técnicas começaram a se desenvolver em 1907, com Harrison e em 1912 com Carrel, que utilizaram dessa metodologia como forma de estudar o comportamento de células animais fora de seus organismos. Os primeiros

testes foram realizados com tubo medular dissecado de rã, mergulhados em linfa fresca e selados com parafina (Jedrzejczak-Silicka, 2017). Apesar disso, no final da década de 1930, o cultivo celular ainda não era considerado um bom método de pesquisa devido às suas dificuldades de replicação e por suas limitadas aplicações na época (Rodríguez-Hernandez et al., 2014).

Um avanço significativo ocorreu na década de cinquenta, quando foi estabelecida uma das mais importantes linhagens celulares. Essas células são oriundas de um adenocarcinoma de uma mulher afro-americana chamada **Henrietta Lacks** (Shiragannavar et al., 2022). Após biópsia, foi constatado que essas células eram muito duráveis e que se replicavam em aproximadamente 24 horas. A linhagem foi então batizada com o nome HeLa e foram imprescindíveis para diversos estudos oncológicos e na produção da vacina Salk, primeira vacina de poliomielite (Turner, 2012; Svalastog e Martinelli, 2013; Rodríguez-Hernandez et al., 2014). As células HeLa são células imortalizadas em razão da presença de uma telomerase que impede a diminuição dos telômeros dos cromossomos durante a divisão celular (Ivancovic et al., 2007). Essa linhagem celular está representada pela Figura 3.

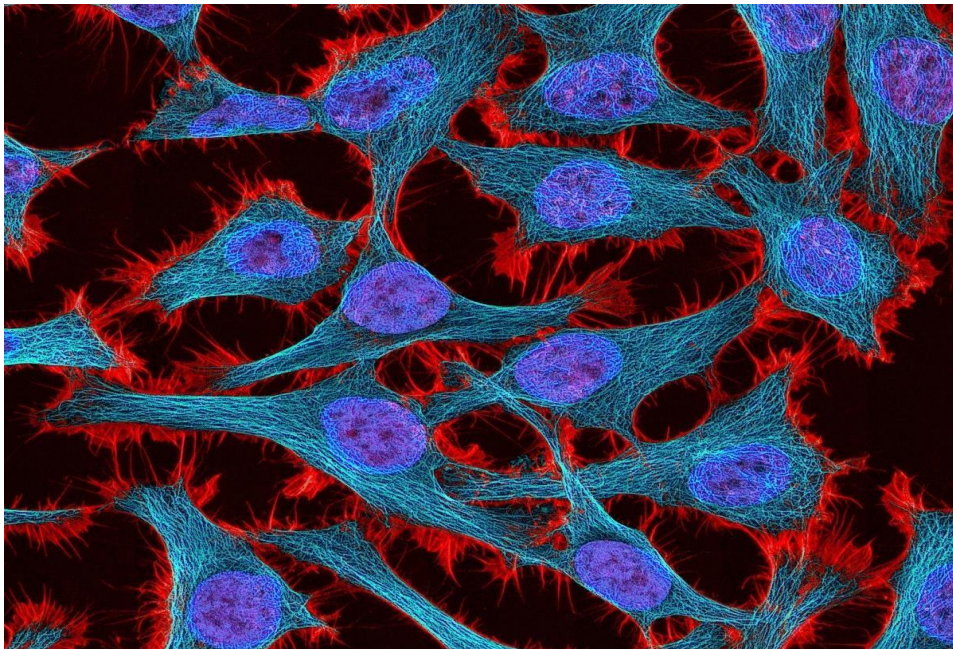


Figura 3. Coloração por fluorescência multifotônica de células HeLa. Núcleo em azul, toxina faloidina ligadora de actina em vermelho, microtúbulos em ciano Fonte: Tom Deenrick (2011) - adaptado.

O cultivo celular se inicia com um cultivo primário. Nesse início, diseca-se o tecido alvo que então é mantido em um ambiente controlado e favorável para o seu desenvolvimento com um meio de manutenção específico. Cada linhagem celular tem suas próprias características de acordo com seu tecido de origem e da espécie da qual foi retirada (Bayar et al., 2012; Siengdee, et al., 2018). O meio artificial deve conter os íons, aminoácidos e vitaminas necessários para a osmorregulação e manutenção dessas células. Necessitam também da presença de gás oxigênio e de dióxido de carbono, temperatura ideal, hormônios de crescimento e muitas vezes, até antibióticos e antifúngicos para impedir o avanço de contaminantes (Onishi et al., 1999; Freshney, 2010; Kwong et al., 2012).

Essas células primárias sofrem senescência replicativa, o que mantém seu crescimento finito (Patil et al., 2020). À medida que ocorre apoptose, as células com maior capacidade de replicação vão se tornando predominantes, mas ainda mantendo suas características originais. A partir desse momento, a linhagem passa a ser denominada como contínua e pode sobreviver até uma média de 80 passagens (Alves e Guimarães, 2010). É possível também modificar as características originais da linhagem mediante luz ultravioleta e outros agentes químicos e físicos. Essas células são denominadas transformadas ou imortalizadas e podem ser subcultivadas por muito mais tempo. Essas linhagens são comercializadas e é possível adquiri-las através de tecidos tumorais (Castilho et al., 2008).

Hoje, a aplicação dessa técnica é extremamente branda, se tornando uma das principais ferramentas no estudo de vírus e na replicação destes para criação de vacinas, eliminando a necessidade de experimentações em animais vivos e em ambientes muito mais controlados (Lindenbach et al., 2005; Leland et al., 2007). Outros estudos promissores focam em produzir tecidos para repor tecidos danificados de humanos (Zorlutuna et al., 2013).

A *Bluegill fry* (BF-2) é uma linhagem celular aderente e oriunda do tronco caudal de bluegill (*Lepomis macrochirus*) e vêm sendo utilizada para isolamento viral de inúmeros patógenos, incluindo iridovírus como o

Megalocytivirus pagrus1 (Nakajima e Sorimachi, 1994; Nishizawa et al., 2008). Ao aderir no fundo dos frascos, ela toma um formato de fibroblasto e sofre mitose até preencher os espaços vazios que existirem na superfície em que cresce. Essa linhagem está ilustrada pela Figura 4.

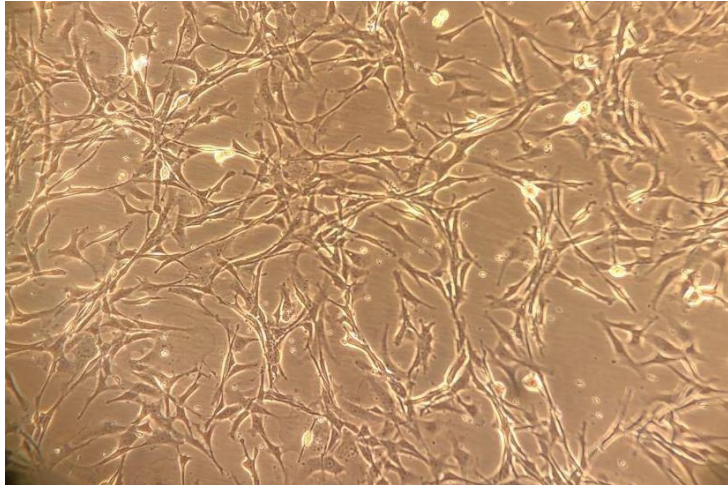


Figura 4. Fotomicrografia de tapete celular de células BF-2 na passagem 41. Células suplementadas com Eagle e 10% de Soro Fetal Bovino após quatro dias de crescimento. Fonte - próprio autor. Microscópio Nikon®. Aumento 20x.

Para combater esses agentes patogênicos são necessárias medidas como criação de kits de diagnóstico para identificar precocemente possíveis doenças nas propriedades comerciais, tratamentos com antivirais em peixes doentes e aplicações de vacinas quando cabíveis (Dong et al., 2023). Também é comum o desenvolvimento de linhagens comerciais mais resistentes a condições climáticas e patogênicas (Filho-Zaniboni et al., 2018; Vela-Avitúa et al., 2023). Atualmente, existem disponíveis diferentes tipos de vacinas comumente utilizadas: vacinas de vírus atenuado vivo, vacina de vírus inativado, vacinas recombinantes, vacinas de subunidade e vacinas de vetor viral (Clem, 2011; Pollard e Bijker 2021). O cultivo celular hoje é amplamente utilizado para a criação de vacinas. Essa técnica utiliza células vivas fora do hospedeiro para que ocorra a multiplicação de vírus (Sykes e Rankin 2013).

Desidera et al. (2022) realizaram uma revisão sistemática sobre linhagens celulares e megalocitivirus. Estes autores utilizaram a metodologia PRISMA e trabalharam com dados secundários extraídos das bases Scopus, Web of Science

e CABDirect, com recorte temporal de 22 anos. Como premissa incluíram apenas artigos científicos que apresentassem informações sobre o ISKNV ou seu gênero e detalhes sobre o isolamento viral nas linhagens celulares. Como resultados verificaram que há uma majoritária predominância de grupos asiáticos liderando as pesquisas sobre cultivo celular com células de peixes, sendo que o primeiro artigo foi publicado em 2008. Dezesete linhagens celulares, predominantemente formadas por fibroblastos foram utilizadas nos isolamentos de megalocitívirus: MFF-1 e MFF-8C1 (Mandarin fish fry); GF e GF-1 (Grouper fin cell); CBP (Chinese perch brain); YFSBF e YFSBB (Yellowfin seabream); PSF (Pearlspot fin); ARB8 (*Aequidens rivulatus* brain); MSH (*Micropterus salmoides* heart); SCSC e SCC (*Siniperca chuatsi*); GP (Giant gourami); GB e GS-1 (orange-spotted grouper); RoBE-4 (rock bream embryo); OmB (primary cell culture); EAGS e EAGSB (grouper *Epinephelus akaara*); PMF (*Pagrus major* fin); ELHK (kidney grouper); SBP, GBC1 e GBC4 (brain tissue) e; SK-9 (Cellosaurus-oncogênica). As linhagens MFF-1 e GF-1 lideram a quantidade de artigos e a eficiência de isolamentos de megalocitívirus. Apesar do amplo uso dessas linhagens citadas, elas não estão presentes nos bancos de células da ATCC (American Type Culture Collection) ou da ECACC (European Collection of Cell Cultures) para se adquirir. Isso dificulta a replicação desses estudos e limitam a realização de novas pesquisas.

Contaminações

Um dos maiores problemas enfrentados pelos laboratórios que trabalham com cultivo celular são as contaminações. Além da adoção de alguns cuidados como utilizar técnicas assépticas ao trabalhar com as células, muitos pesquisadores produzem guias de boas práticas laboratoriais para minimizar esses riscos (Coecke et al., 2005). As maiores causas de contaminações são atreladas a falhas do operador ou a dificuldade de manter tanto os materiais como o ambiente de trabalho estéreis (Stacey, 2011). Os agentes mais comuns são fungos, vírus, bactérias e micoplasma e a contaminação por esses agentes pode levar a morte das células presentes nos frascos de cultivo, bem como levar

ao fim da experimentação (Langdon, 2004; Mirjalili et al., 2005).

Há uma grande preocupação com fungos, já que quando contaminam linhagens celulares os antifúngicos potentes são citotóxicos e podem danificar a estrutura celular. No caso de bactérias, há a possibilidade de o patógeno não ser completamente erradicado pelo tratamento e voltar posteriormente a se replicar com maior resistência (Stacey, 2011).

Devido à importância que o cultivo celular tem nos estudos de microbiologia, virologia e toxicologia, a presente dissertação buscou utilizar essa ferramenta para comparar cepas do vírus *Megalocytivirus pagrus1* (genótipo ISKNV) de diferentes regiões hidrográficas do estado de São Paulo/Brasil. Para tanto, implantamos um laboratório de cultivo celular no Centro de Aquicultura do Instituto de Pesca de São Paulo, que trabalha exclusivamente com células de animais ectotermos. Sequencialmente, inoculamos o vírus presente em órgãos de peixes infectados com ISKNV em células BF-2. Adicionalmente, investigamos a eficiência da irradiação de raios gama na esterilização de materiais utilizados no cultivo celular. Isso permitiria a reutilização desses materiais nos procedimentos laboratoriais, diminuindo o custo e o passível ambiental gerado.

Conforme as normativas do Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca, essa dissertação está dividida em dois capítulos escritos na forma de artigos científicos:

Capítulo 1 - Investigação de *Megalocytivirus pagrus1* (genótipo ISKNV) em tilapiculturas no Estado de São Paulo (Brasil): Isolamento e análise de cepas circulantes

Capítulo 2 - Utilização da radiação ionizante como alternativa sustentável na esterilização de equipamentos para Cultivo Celular.

Referências Bibliográficas

Battersby, J. 2017. MDGs to SDGs–new goals, same gaps: The continued absence of urban food security in the post-2015 global development agenda. *Afr Geogr Rev* 36: 115–129.

Bayar, G.R.; Aydıntuğ, Y.S.; Günhan, O.; Oztürk, K.; Gülses, A. 2012. Ex vivo produced oral mucosa equivalent by using the direct explant cell culture technique. *Balkan Med J* 29(3): 295-300

Carneiro, C.J.; Brum, L.A.; Thesing, J.N; Prochnow, A.D. 2022. Cadeia produtiva da piscicultura: um olhar para a evolução da tilapicultura no Brasil. *Rev Persp* 46: 25–34.

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. *J Gen Virol.* 98(5): 890-891.

Clem, A.S. 2011. Fundamentals of vaccine immunology. *J Glob Infect Dis* 3(1): 73- 78.

Coecke, S.; Balls, M.; Bowe, G.; Davis, J.; Gstraunthaler, G.; Hartung, T.; Hay, R.; Merten, O.W.; Price, A.; Schechtman, L.; Stacey, G.; Stokes, W. 2005. Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim* 33(3): 261-87.

Dong, H.T.; Chaijarasphong, T.; Barnes, A.C.; Delamare-Deboutteville, J.; Lee, P.A.; Senapin, S.; Mohan, C.V.; Tang, K.F.; McGladdery, S.E.; Bondad-Reantaso, M.G. 2023. From the basics to emerging diagnostic technologies: What is on the horizon for tilapia disease diagnostics? *Rev Aquac* 15: 186–212.

Filho-Zaniboni, E., Pedron, J.S.; Ribolli, J. 2018 Oportunidades e desafios para a aquicultura em reservatórios brasileiros: uma revisão. *Assoc Bras de Limnol* 30: 302.

Freshney, R.I. 2010. Culture of animal cells, a manual of basic technique and specialized applications. 6th Ed, Cap 4: 37-56. Online ISBN:9780470649367.

Fusianto, C.K.; Hick, P.M.; Murwantoko; Herlambang, A.; Whittington, R.J.; Becker, J.A. 2021. Outbreak investigation attributes Infectious spleen and kidney necrosis virus as a necessary cause of a mortality epidemic in farmed grouper (*Epinephelus* spp.) in Bali, Indonesia. *Aquac Rep* 20: 100723.

Fusianto, C.K.; Becker, J.A.; Subramaniam, K.; Whittington, R.J.; Koda, S.A.; Waltzek, T.B.; Murwantoko; Hick, M.P. 2023. Genotypic Characterization of Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus (ISKNV) in Southeast Asian Aquaculture". *Transbound Emerg Dis* 3: 1-16.

Go, J.; Waltzek, T.B.; Subramaniam, K.; Yun, S.C.; Groff, J.M.; Anderson, I.G.; Chong, R.; Shirley, I.; Schuh, J.C.; Handler, J.H.; Tweedie, A.; Whittington, R.J. 2016. Detection of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) and turbot reddish body iridovirus (TRBIV) from archival ornamental fish samples. *Dis Aquat Org* 122(2): 105–123.

He, J.G.; Deng, M.; Weng, S.P.; Li, Z.; Zhou, S.Y.; Long, Q.X.; Wang, X.Z.; Chan

S.M. 2001. Complete Genome Analysis of the Mandarin Fish Infectious Spleen and Kidney Necrosis Iridovirus. *Virology* 291: 126-139.

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 Pathol* 27: 19-27.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2024. Disponível em:

https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202303730&taxon_name=Megalocytivirus%20pagrus1. Acesso em 30/11/2024.

Ivanković, M.; Cukusić, A.; Gotić, I.; Skrobot, N.; Matijasić, M.; Polancec, D.; Rubelj, I. 2007. Telomerase activity in HeLa cervical carcinoma cell line

proliferation. *Biogerontology* 8(2):163-72.

Jedrzejczak-Silicka M. 2017. New Insights into Cell Culture. Caítulo 1: History of Cell Culture. InTech. ISBN: 978-953-51-3134-2

Kibenge, F.S.B. 2016. Determinants of emergence of viral diseases in aquaculture. In *Aquac Virol* 2016: 95-116.

Kibenge, F.S.B. 2019. Emerging viruses in aquaculture. *Coviro* 34: 97-103. Kurita, J.; Nakajima, K. 2012. Megalocytiviruses. *Viruses* 4(4): 521-538.

Kwong, P.J.; Abdullah, R.B.; Khadijah, W.E. 2012. Increasing glucose in basal medium on culture Day 2 improves in vitro development of cloned caprine blastocysts produced via intraspecies and interspecies somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 78: 921-929.

Langdon, S.P. 2004. Cell culture contamination: an overview. *Methods Mol Med.* 88: 309-317.

Leland, D.S.; Ginocchio, C.C. 2007. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev* 20(1): 49-78.

Lindenbach, B.D.; Evans, M.J.; Syder, A.J.; Wölk, B.; Tellinghuisen, T.L.; Liu, C.C.; Rice, C.M.; 2005. Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science* 309(5734): 623- 626.

Little, D.C.; Newton, R.W.; Beveridge, M.C.M. 2016. Aquaculture: a rapidly growing and significant source of sustainable food? Status, transitions and potential. *Proc Nutr Soc* 75: 274-286.

Mirjalili, A.; Parmoor E.; Moradi Bidhendi, S.; Sarkari B. 2005. Microbial contamination of cell cultures: A 2 years study. *Biologicals* 33(2): 81-85.

Nakajima, K.; Sorimachi, M. 1994. Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol* 29: 29-33.

Nishizawa, T.; Kokawa, Y.; Wakayama, T.; Kinoshita, S.; Yoshimizu, M. 2008. Enhanced propagation of fish nodaviruses in BF-2 cells persistently

infected with snakehead retrovirus (SnRV). *Dis Aqual Org* 79: 19-25.

Oliveira, C.R.; Alfaia, S.R.; Ikari, F.L.; Tavares, S.; Sousa, R.L.M.; Harakawa, R.; Ferreira, C.M. 2020. Detection and molecular characterization of Frog virus 3 in bullfrogs from frog farms in Brazil. *Aquaculture* 516(11): 734575.

Onishi, T.; Kinoshita, S.; Shintani, S.; Sobue, S.; Ooshima, T. 1999. Stimulation of proliferation and differentiation of dog dental pulp cells in serum-free culture medium by insulin-like growth factor. *Arch Oral Biol* 44: 361-371.

Pollard, A.J.; Bijker, E.M. 2021. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol* 2: 83-100.

Qin, P.; Munang'andu, H.M.; Xu, C.; Xie, J. 2023 Megalocytivirus and Other Members of the Family Iridoviridae in Finfish: A Review of the Etiology, Epidemiology, Diagnosis, Prevention and Control. *Viruses* 15: 1359.

Ramírez-Paredes, J.G.; Paley, R.K.; Hunt, W.; Feist, S.W.; Stone, D.M.; Field, T.R.; Haydon, D.J.; Ziddah, P.A.; Nkansa, M.; Guildler, J.; Gray, J.; Duodu, S.; Pecku, E.K.; Awuni, J.A.; Wallis, T. S.; Verner-Jeffreys, D.W. 2021. First detection of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) associated with massive mortalities in farmed tilapia in Africa. *Transbound Emerg Dis* 68(3): 1550-1563.

Rodríguez-Hernandez, C.M.; Garcia, S.E.T.; Sandoval, C.O.; Castillo, F.Y.R.; Muro, A.L.; González, F.J.A.; Barrera, A.L.G. 2014. Cell Culture: History, Development and Prospects. *Int J Curr Res Aca Rev* 2: 188-200.

Shi, C.Y.; Jia, K.T.; Yang, B.; Huang, J. 2010. Complete genome sequence of a Megalocytivirus (family Iridoviridae) associated with turbot mortality in China. *Virol J* 7:159

Shiragannavar, V.D.; Gowda, N.G.S.; Santhekadur, P.K. 2022. Our Shero HeLa and Her Immortal Life: The Story Behind the Famous Hela Cells. *Resonance* 27: 1731-1736.

Shuang, F.; Luo, Y.; Xiong, X.P.; Weng, S.; Li, Y.; He, J.; Dong, C. 2013. Virions proteins of an RSIV-type megalocytivirus from spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus* (SKIV-ZJ07). *Virology* 437(2): 89-99.

Siengdee, P.; Klinhom, S.; Thitaram, C.; Nganvongpanit, K. 2018. Isolation and culture of primary adult skin fibroblasts from the Asian elephant (*Elephas maximus*). *PeerJ* 24;6: e4302.

Song, J.Y.; Kitamura, S.I.; Jung, S.J.; Miyadai, T.; Tanaka, S.; Fukuda, Y.; Kim, S.R.; Oh, M.J. 2008. Genetic variation and geographic distribution of megalocytiviruses. *J Microbiol* 46: 29-33.

Stacey, G.N. (2011). Cell Culture Contamination. In: Cree, I. (eds) *Cancer Cell Culture*. Meth in Mol Biol 731. Humana Press.

Subramaniam, K.; Shariff, M.; Omar, A.R.; Hair-bejo, M. 2012. Megalocytivirus infection in fish. *Rev Aquac* 4: 221-233.

Svalastog, A.L.; Martinelli, L. 2013. Representing life as opposed to being: the bio- objectification process of the HeLa cells and its relation to personalized medicine. *Croat Med J* 54(4): 397-402.

Sykes, J.E.; Rankin, S.C. 2014. Isolation in Cell Culture. *Can and Fel Infec Dis* 2014: 2-9.

Turner T. 2012. Development of the polio vaccine: a historical perspective of Tuskegee University's role in mass production and distribution of HeLa cells. *J Health Care Poor Underserved*. 23: 5-10.

Vela-avitúa, S.; Lafrentz, B.R.; Lozano, C.A.; Shoemaker, C.A.; Ospina-arango, J.F.; Beck, B.H.; Rye, M. 2023. Genome-wide association study for *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) identifies a significant QTL for disease resistance. *Front Genet* 14: 1078381.

World Organisation of Animal Health. 2024. Aquatic code. Disponível em: <https://www.woah.org/app/uploads/2024/05/g91-2024-res-28-tech-aquatic-code-en.pdf>. Acesso em 30/11/2024.

Zorlutuna, P.; Vrana, N.E.; Khademhosseini, A. (2013). The expanding world of tissue engineering: the building blocks and new applications of tissue engineered constructs. *Rev Biomed Eng* 6:47-62.

CAPÍTULO 1

Investigação do *Megalocytivirus pagrus1* (genótipo ISKNV) em tilapiculturas no Estado de São Paulo (Brasil): Isolamento e Análise de Cepas Circulantes

Resumo

A intensificação das técnicas de manejos nas pisciculturas tem facilitado o surgimento e a disseminação de patógenos, causando grandes prejuízos econômicos e sanitários. O *Megalocytivirus pagrus1* (genótipo ISKNV) é um patógeno emergente de grande preocupação para a aquicultura, conhecido por afetar uma ampla gama de espécies de peixes, incluindo tilápias. A capacidade deste vírus de causar mortalidade significativa em pisciculturas, reforça a necessidade urgente de métodos eficazes de diagnóstico e controle. Neste sentido, os estudos com cultivos celulares são essenciais para a compreensão da biologia e patogenicidade viral. Este estudo teve como objetivo investigar o comportamento do ISKNV em linhagens de células Bluegill Fry 2 (BF-2), a partir de amostras coletadas em duas tilapiculturas localizadas em diferentes bacias hidrográficas no estado de São Paulo, Brasil. Após a confirmação da presença do patógeno por PCR convencional e qPCR, as amostras positivas seguiram para isolamento. Para este propósito, utilizamos três amostras de cada piscicultura e realizamos três passagens para cada frasco inoculado. Confirmamos a presença do vírus por qPCR nas células inoculadas, porém não foi possível observar efeito citopático mesmo após 21 dias de inoculação. Esses achados indicam que, embora o vírus esteja presente e possa ser detectado por técnicas moleculares, sua replicação nas células BF-2 pode não resultar em efeitos citopáticos visíveis. Isso sugere a necessidade de investigações adicionais para esclarecer os mecanismos de infecção e replicação do ISKNV, além de testar outras linhagens celulares mais susceptíveis ou ajustar as condições de cultivo para melhor compreensão da patogenicidade do vírus e desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e mitigação.

Palavras-chave: Iridovirus, Cultivo celular, *Megalocytivirus*, Efeito citopático, Iridovírus.

1. Introdução

A aquicultura tem se tornado uma importante fonte de proteína animal, contribuindo significativamente para a segurança alimentar global (FAO, 2024). No entanto, os sistemas intensivos de cultivo muitas vezes utilizados pelas pisciculturas facilitam o surgimento e a disseminação de diversos patógenos, causando grandes prejuízos econômicos e sanitários (Ramírez-Paredes et al. 2021; Fusianto et al. 2021).

Em 2024, houve uma proposta para os órgãos competentes de alteração de nomenclatura desse vírus. Sugeriu-se o formato binomial utilizando o nome do gênero ao qual a espécie pertence e do organismo em que o vírus foi inicialmente encontrado. Desse modo, o ISKNV passou a ser chamado *Megalocytivirus pagrus1* (ICTV, 2024; World Organisation of Animal Health; 2024).

O *Megalocytivirus pagrus1* (genótipo ISKNV) é um patógeno emergente pertencente aos Megalocitivirus e de grande preocupação para a aquicultura, conhecido por afetar uma ampla gama de espécies de peixes de águas marinhas e continentais, incluindo tilápias (Ramírez-Paredes et al., 2021, Sah Putra et al. 2020, Sukenda et al. 2020; Fusianto et al. 2021). Originalmente descrito na Ásia (Inouye et al., 1992). Este patógeno tem se espalhado para outras regiões, inclusive o Brasil, onde foi recentemente detectado em pisciculturas de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) chegando até em nossa fauna nativa em peixes como o tucunaré (*Cichla ocellaris*), acará (*Geophagus brasiliensis*) e piranha amarela (*Serrasalmus maculatus*) (Figueiredo et al. 2021; Pereira et al., 2024; Paz, 2023). Em 2024 a OIE classificou o patógeno como notificação obrigatória.

Este vírus só foi isolado pela primeira vez em peixe-mandarim (*Siniperca chuatsi*) no ano de 1998 após causar grandes perdas na China (He et al., 2001). Ele foi classificado como um Megalocitivirus após a caracterização da sua proteína de capsídeo principal (MCP). Os principais sinais clínicos da doença são: anorexia, letargia, rápido movimento opercular, melanose, exoftalmia e distensão abdominal (Dong, 2014; Weber et al., 2009; Xu et al., 2008). Atualmente

sabe-se que algumas espécies podem estar infectadas subclínicamente (Guo et al., 2012; Wang et al., 2007).

A capacidade de *Megalocytivirus pagrus1* (genótipo ISKNV) de causar mortalidade significativa em pisciculturas confirma a necessidade urgente de métodos eficazes de diagnóstico. Um método que se popularizou muito tanto para a elaboração de vacinas como de kits de diagnóstico é a utilização do cultivo celular (Cc) como agente de isolamento e multiplicação dos vírus, já que esses patógenos necessitam de células vivas de um hospedeiro para se replicar (Sykes e Rankin 2014). O Cc foi utilizado para criação de vacinas como a de influenza e é considerado um meio eficiente e rápido para a síntese desses componentes (Nicolson et al., 2005). Estudos com Cc são essenciais para a compreensão da biologia e patogenicidade dos vírus de organismos aquáticos e uma excelente ferramenta biológica em experimentos que envolvam genes de virulência, pois desempenham papel fundamental para entender como os genes afetam as células hospedeiras. No Brasil esta técnica de diagnóstico é comum para mamíferos, mas para animais ectotermos os estudos de isolamento viral, assim como os laboratórios são ainda insipientes.

A *Bluegill Fry* (BF-2) é uma linhagem celular aderente oriunda do tronco caudal de bluegill (*Lepomis macrochirus*) e utilizada para isolamento viral de inúmeros patógenos inclusive o ISKNV. A BF-2 possui morfologia fibroblástica e é uma linhagem que pode ser adquirida comercialmente. Ela foi testada por Nakajima e Sorimachi (1994), juntamente com outras 10 linhagens celulares, no isolamento do RSIV. Em seus resultados, esses autores descrevem os efeitos citopáticos (ECP) observados como o aumento volumétrico e arredondamento das células infectadas. Entretanto, alguns autores reportam dificuldades a ausência de ECP visíveis no isolamento do ISKNV, o que pode representar um desafio adicional na identificação e caracterização deste vírus (Oh & Nishizawa, 2016). O isolamento deste vírus é um desafio e o título viral diminui normalmente após a passagem em série (Nakajima & Sorimachi 1994).

Os vírus da família *Iridoviridae*, mesmo sendo o que chamamos de “DNA vírus”, são conhecidos por exibirem perfis recombinantes tornando-se

muitas vezes mais patogênicos (Claytor et al. 2017; Ferreira et al., 2021). Esta possibilidade, aliada ao fato de termos poucos estudos sobre os genes de virulência desta família, seu mecanismo de ação e como são ativados ou desativados durante os processos de infecção, nos levou a investigar o comportamento em Cc de diferentes amostras positivas para *Megalocytivirus pagrus1* (genótipo ISKNV), circulantes em pisciculturas de criação intensiva no Brasil. O isolamento viral deste patógeno e o estudo das cepas circulantes no país irá contribuir para um melhor entendimento de sua epidemiologia e mecanismos de infecção.

2. Material e Métodos

Rastreamento do Megalocytivirus pagrus1 (genótipo ISKNV)

Realizamos coletas em duas diferentes pisciculturas no Estado de São Paulo/Brasil (n=306), pertencentes a distintas regiões hidrográficas (Ilha solteira e Paranapanema), distantes 150 Km uma da outra. Estas fazendas de criação trabalham com engorda de *Oreochromis niloticus* em sistema tanque-rede. Nestes locais, havia relatos de mortalidade de alevinos e suspeita da presença do vírus ISKNV devido aos sinais clínicos apresentados. Em laboratório, os animais foram eutanasiados por sedação profunda através da utilização de solução de 8 mL de eugenol e 50 mL de álcool 70%, adicionando 1 mL dessa solução para cada 1 litro de água. A necrópsia foi realizada após secção medular, retirando os órgãos alvos deste patógeno, ou seja, baço e rim.

Este procedimento foi revisado e autorizado pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Pesca - CEUA-IP 005/2022. Em virtude do peso médio dos alevinos ($19,44\text{g} \pm 8,94\text{g}$), os órgãos de cada três peixes foram agrupados em pool (n = 102). Essas amostras foram divididas em duas partes e acondicionadas em diferentes criotubos: um para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) e rastreamento do patógeno, e outro contendo meio Eagle modificado por Dubelco (DMEM - Sigma®) e SFB (Cultilab®) para o isolamento viral (Go et al., 2016).

Descongelamento e Subcultivo celular

Células BF-2 foram importadas da ATCC® (American Type Culture Collection), transportadas e mantidas em nitrogênio líquido, até sua utilização. O descongelamento foi realizado de acordo com o protocolo disponibilizado pela própria empresa com algumas modificações. Após retirada das células do nitrogênio, o criotubo foi imediatamente imerso em banho-maria a $24,0 \pm 0,5$ °C por 5 minutos com leve agitação até o descongelamento total do conteúdo. Previamente preparamos uma solução contendo 80% de meio Eagle (Sigma®) e 20% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®), com um volume final de 12 mL. Todo o conteúdo do criotubo contendo as células descongeladas foram adicionadas a essa solução em um frasco de 75 cm², e permaneceram em repouso em uma incubadora PHCBI a uma temperatura de 23,5 °C com 5% CO₂ por 24 horas. Sequencialmente, o meio de cultura foi descartado e substituído por novo meio de manutenção com 10% de SFB.

As células foram observadas diariamente em microscópio Nikon® para verificar sua adesão à superfície do frasco. Ao atingirem entre 80% e 90% (4×10^5 células por mL) foi realizado o subcultivo. Para isso, o meio foi retirado e foi realizada uma lavagem da camada de células com solução de tampão fosfato (PBS) para remover todos os vestígios de SFB que contém inibidor de tripsina. Adicionamos 1,0 mL de solução de Tripsina-EDTA ao frasco de 75 cm² e observamos as células sob um microscópio invertido até que a camada de células se desprendesse (5 minutos). Ao final, pequenas batidas foram feitas no frasco para que as células se soltassem. Adicionamos então 4,0 mL de meio de crescimento completo (10% SFB + 90% Eagle) e o ressuspendemos com as células em suspensão. O conteúdo foi então transferido para dois novos frascos de 75 cm² (1:2) e o subcultivo observado diariamente.

Reação em Cadeia da Polimerase

As amostras (102 pools de baço e rim) foram processadas utilizando-se

para extração do DNA total, o Kit da Wizard® Genomic DNA Purification (A1120 Promega®), seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada em NanoDrop®, e a concentração de DNA foi ajustada para 1000-2000 ng/ μ L utilizando a solução de reidratação fornecida pelo próprio kit de extração.

A partir do DNA extraído, foi realizado um PCR convencional para confirmação da presença do vírus. Para a amplificação do DNA foi utilizado MasterMix GoTaq® G2-Promega® e utilizando os primers descritos por Kurita e Nakajima (2012) gerando um fragmento de 777pb. A sequência corresponde ao gene da proteína principal de capsídeo. Em seguida, foi realizada eletroforese em gel de agarose com concentração de 2,4% por 30 minutos.

As amostras positivas para PCR foram purificadas e sequenciadas pelo método Sanger em sequenciador automático ABI Prism® Genetic Analyzer 3100 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, EUA).

Posteriormente, as amostras foram reanalisadas por qPCR. Para o desenvolvimento da curva padrão e para a quantificação absoluta do ISKNV, construímos um plasmídeo utilizando fragmentos gerados através do PCR convencional. O amplicons foram purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®), ligados ao vetor pGEM- T-Easy, e transformados em *Escherichia coli*. As colônias foram então inoculadas em meio líquido e a extração do DNA do plasmídeo realizada utilizando o kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, EUA). Os primers utilizados foram ISKNV104R-F e ISKNV104R-R com base no artigo de Koda *et al.* (2023).

Sequencialmente, para o PCR Tempo Real utilizamos o Gotaq® Probe qPCR Master Mix (Promega®) seguindo as especificações do fabricante. Primeiro, preparamos a solução adicionando 5 μ L de Master Mix, 0,25 μ L de sonda, 2 μ L de água livre de nuclease, 0,6 μ L de cada primer (forward e reverse). Utilizamos os primers sugeridos por Kurita e Nakajima (2012). O volume de cada componente foi multiplicado pela quantidade de amostras que seriam testadas e

depois multiplicada por 2 já que a reação foi feita em duplicata. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 8 μL da solução e depois mais 2 μL de cada amostra com concentração de 10 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$. Nos últimos dois poços foram adicionados apenas a solução sem amostras para servir como controle. A placa foi então selada e a amplificação ocorreu no termociclador Applied Biosystems® e os resultados do CT de cada amostra foram coletados. Consideramos positivos para ISKNV os CTs superiores a 40 (Fusianto et al., 2021).

Utilizamos a Beta-actina como controle endógeno. Para isso realizamos o mesmo procedimento descrito acima, porém utilizando o Mastermix e os primers específicos. A Beta-actina é comumente utilizada como controle por estar presente na maior parte das células e tecidos. Desse modo é possível verificar se as variações das expressões gênicas são derivadas de erros na extração (Giuliette et al., 2001; Li et al., 2010).

Processamento das amostras e Isolamento viral

Foram realizadas seis inoculações (20% das amostras positivas para ISKNV) em células BF-2 para isolamento viral e observação de ECP, totalizando três inoculações para cada uma das regiões hidrográficas coletadas (Ilha Solteira e Paranapanema). Acrescentamos a experimentação um frasco com células BF-2 e meio EMEM (Sigma ®), sendo usado como controle negativo com o objetivo de comparação de possíveis alterações no tapete celular. Foram utilizados ao total 21 frascos de 25 cm^2 que foram acompanhados por 21 dias realizando passagens a cada sete dias. O delineamento do experimento pode ser visualizado na Figura 1.

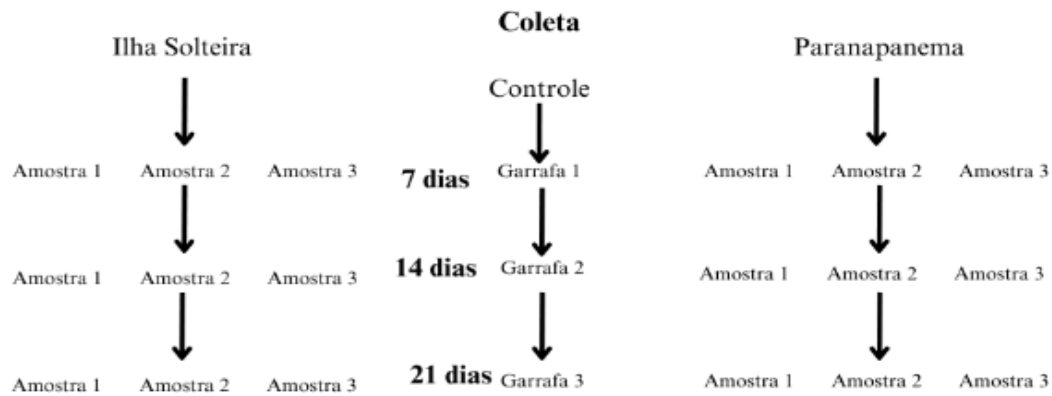


Figura 1 – Delineamento experimental das inoculações com vírus da necrose infecciosa de baço e rim (*Megalocyttivirus pagrus1* – genótipo ISKNV) das regiões de Ilha Solteira e Paranapanema em linhagem celular Bluegill fry-2 (BF2).

Basicamente, em um almofariz foram adicionados os 50 mg de tecido juntamente com 1,0 mL de meio mínimo essencial de Eagle (EMEM Sigma®) com 1% de penicilina (100 UI/ mL^{-1}), 1% de estreptomicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 2% de anfotericina B ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$), até sua completa homogeneização. Os conteúdos foram então realocados para tubos de 2 mL, agitados e guardados na geladeira a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas. Sequencialmente, as amostras foram submetidas ao congelamento no freezer a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Após o descongelamento, os tubos foram centrifugados a $2500 \times g$ por 10 minutos a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos tubos de 2 mL. As primoinoculações seguiram a partir da amostra concentrada com quantidade de $500 \mu\text{L}$ em cada frasco de 25 cm^2 . Para isso retiramos o meio de cultivo dos frascos, lavamos com PBS, inoculamos a amostra preparada e deixamos na estufa a $23,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ com 5% de gás carbônico por uma hora. Após esse tempo, realizamos uma nova lavagem com PBS para retirar moléculas citotóxicas e adicionamos 5 mL de meio de cultivo a 2% de SFB. Após sete dias, as células foram descoladas com uso de um scraper e metade do conteúdo foi realocado para um tubo para quantificação por qPCR, posteriormente.

Para realizar a segunda passagem do inóculo foram feitos três ciclos de congelamento e descongelamento para garantir a lise celular. Em seguida, em

um frasco previamente preparado com monocamada de células BF-2, o meio foi retirado, o tapete celular foi lavado com PBS e foi inoculado com 1 mL do meio do frasco junto com as células lisadas (*i.e.*, passagem 1). Após uma hora, 4 mL de meio novo com 2% de SFB foi adicionado sem realizar nova lavagem. Esse processo foi repetido a cada 7 dias até 21 dias. Os frascos foram observados diariamente para verificar o aparecimento de ECP.

Confirmação da inoculação do vírus

Para confirmar o isolamento do vírus ISKNV foram realizados testes de qPCR e quantificação do CT a cada inoculação. A extração das amostras foi realizada utilizando o kit Wizard Genomic Kit G2 (Promega®) seguindo as instruções do fabricante para extração de cultivo celular. Com o DNA extraído, realizamos o qPCR utilizando o kit Gotaq® Probe qPCR Mastermix (Promega®).

3. Resultados

Rastreamento do ISKNV

Do total de 306 peixes (102 pools) que foram amostrados nas criações intensivas de tilápias, tivemos em média um total de 34% de positividade (PCR convencional e qPCR) para *Megalocytivirus pagrus1* (genótipo ISKNV) que ocorreu em ambas as pisciculturas (Tabela 1).

Tabela 1: Informações sobre as coletas realizadas para rastreamento do *Megalocytivirus pagrus1* (genótipo ISKNV) em diferentes pisciculturas do Estado de São Paulo/Brasil (2023-2024).

Região da Piscicultura	Número de peixes	Número de pools*	Frequência de ISKNV	Peso médio	Estação do ano (HS)
Ilha Solteira	171	57	35%	17,1g \pm 8,2	Outono
Panorama	135	45	33%	23,0g \pm 8,7	Primavera

*Um pool representa 3 peixes. HS - Hemisfério Sul. Ilha Solteira (-20.4279° S, -51.3448° O); Panorama (-21.3564° S, -51.8606° O).

Cultivo Celular

Após 96 horas do descongelamento das células BF-2 a cultura foi visualizada em microscópio óptico de inversão. Nesta ocasião não foi possível observar o tapete celular, mas apenas com algumas células dispersas. Às 168 horas observamos uma quantidade maior de células, mas muito espaçadas e com pouca confluência. Às 192 horas optamos por trocar o meio para aumentar a confluência celular, acrescentando 20% de SFB e 80% de Eagle. Às 216 horas observamos aumento considerável da confluência que atingiu cerca de 40% da garrafa. Esta sequência de eventos pode ser visualizada na Figura 2.

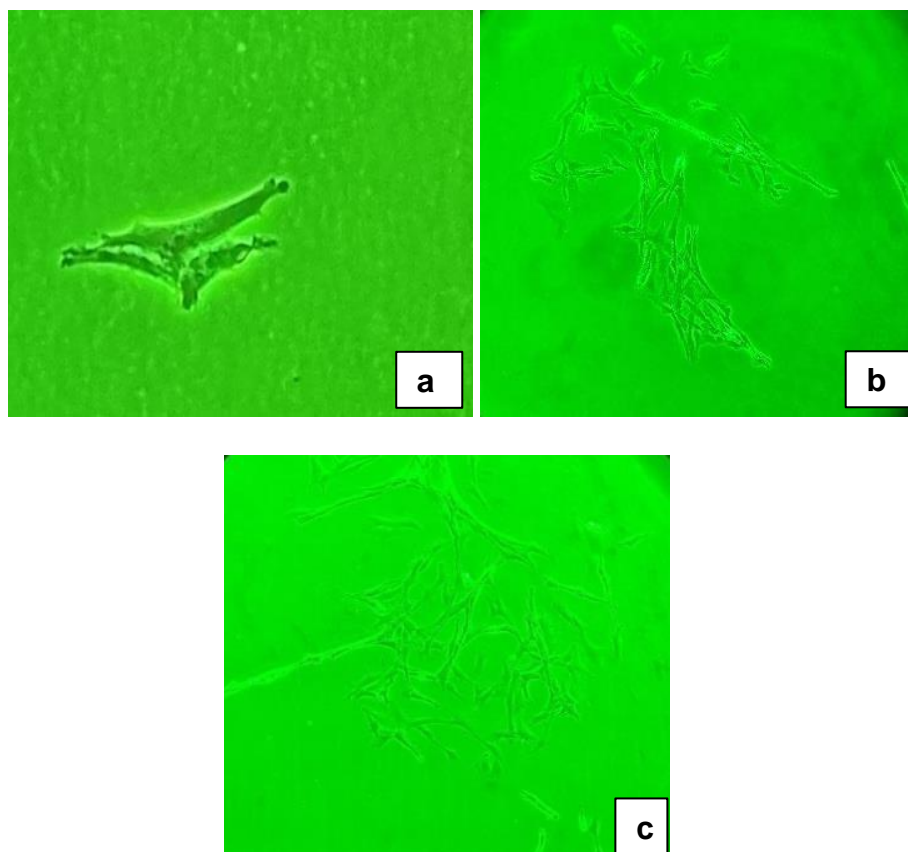


Figura 2. Fotomicrografia de fibroblastos da linhagem celular BF-2 (*Bluegill Fry*), adquiridas da ATCC (American Type Culture Collection) e descongeladas três meses após sua chegada ao laboratório de cultivo celular do Instituto de Pesca. (a) - Fibroblasto 96 horas - Aumento 400X. (b) - Fibroblastos com 168 horas - Aumento 200x. (c) - Fibroblastos com 192 horas - Aumento 200x. Microscópio invertido Nikon®, com filtro com contraste de fase.

Isolamento de Megalocytivirus pagrus1 (genótipo ISKNV) em células BF-2

As quantidades de partículas virais iniciais das amostras de Ilha Solteira e as médias dos CTs foram respectivamente: $3,12 \times 10^4$ (24,31), $3,97 \times 10^4$ (23,96) e $9,46 \times 10^1$ (32,86) partículas virais por microlitro. Para as amostras de Paranapanema foram $1,20 \times 10^4$ (25,73), $1,19 \times 10^3$ (29,13) e $4,12 \times 10^1$ (34,0) partículas virais por microlitro.

Até a terceira Passagem (21 dias) não foram constatados ECP visíveis entre as amostras positivas para *Megalocytivirus pagrus1* (genótipo ISKNV) obtidas em diferentes regiões hidrográficas (Ilha Solteira e Paranapanema)

(Figura 3), apesar da presença do *patógeno* ter sido confirmada pelo qPCR.

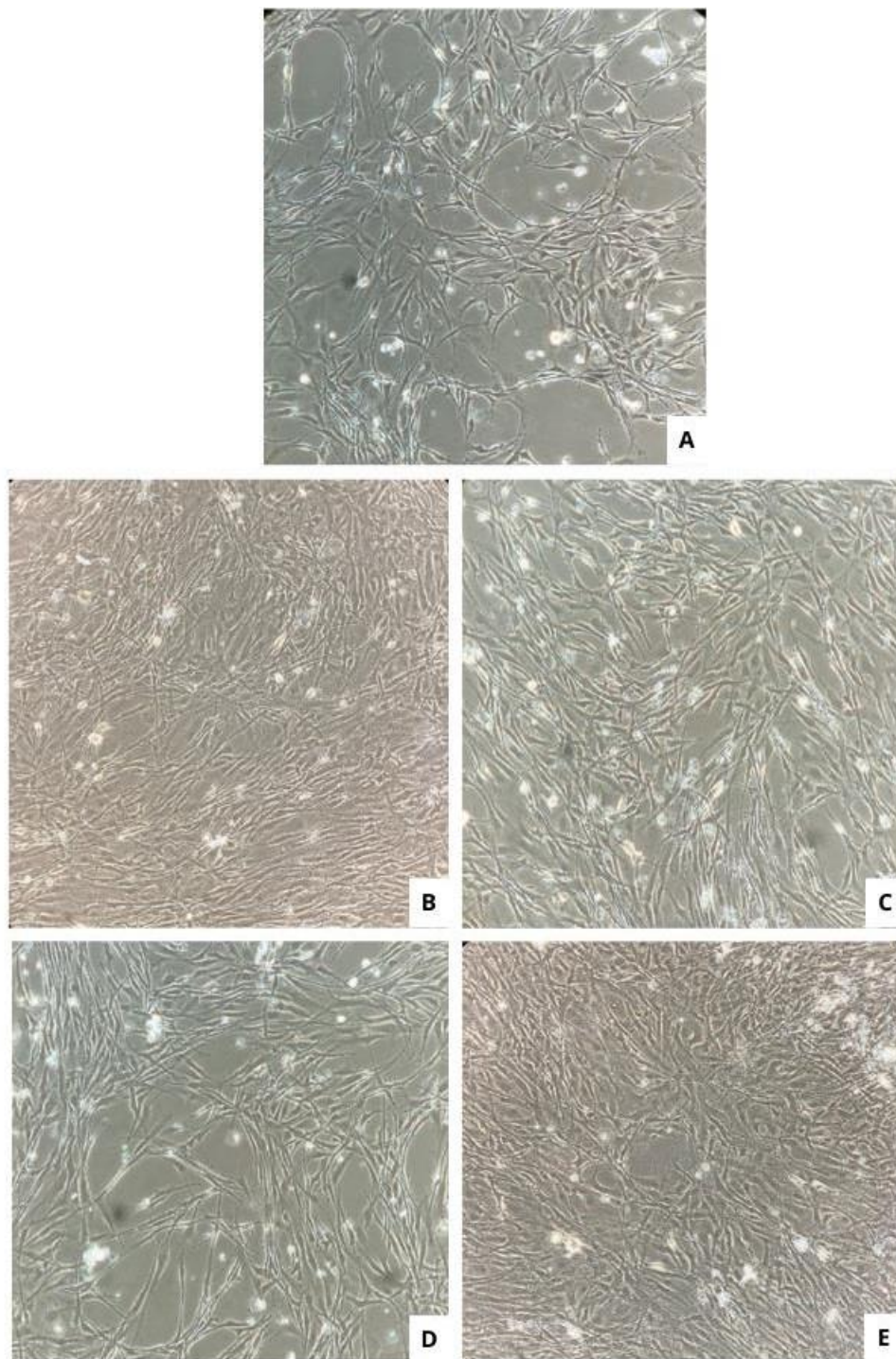


Figura 3. Fotomicrografia de monocamada de células Bluegill Fry (BF-2) inoculadas com vírus de necrose infecciosa de baço e rim (ISKNV), 7 e 14 dias após início do experimento. (A) Controle negativo - 7 dias; (B) Amostra de Ilha Solteira - 7 dias; (C) Amostra de Ilha Solteira - 14 dias; (D) Amostra de Paranapanema - 7 dias; (E) Amostra de Paranapanema - 14 dias. Imagens de microscópio invertido Nikon® com aumento de 200x.

4. Discussão

A manipulação de células em Cc é uma tendência global, fomentada pela demanda do entendimento dos mecanismos de ação vírus-hospedeiro. Neste sentido, as pesquisas para encontrar linhagens que sejam mais suscetíveis a diferentes agentes patogênicos são crescentes. Estes estudos podem ajudar a compreender a dinâmica das infecções virais e a determinar o momento adequado para análises mais detalhadas, como a quantificação viral e estudos de virulência.

Para elucidar o padrão de possíveis recombinações e mecanismos de ação dos megalocitovírus, Chao et al. (2004) estudaram a ATPase de iridovirus de garoupa de Taiwan (TGIV) encontrando exata similaridade com o ISKNV e 90% de similaridade com RSIV. É proposto que ambos os vírus possuam um ancestral em comum e através de recombinações e mutações, o TGIV tenha passado de um vírus com hospedeiro de água salgada, para um vírus capaz de infectar organismos de água doce como o peixe mandarim (He et al. 2001; Chao et al. 2004). Kurita e Nakajima (2012) também inferiram que as cepas de ISKNV apresentam uma menor taxa de recombinação de genes do que o RSIV. Outros fatores que podem levar a portadores assintomáticos são estirpes de megalocitovírus que não são virulentas ou patogênicas para determinadas espécies, novas espécies hospedeiras nas quais o vírus não tem um forte tropismo celular ou tecidual, ou a evolução da imunidade do hospedeiro ao longo do tempo. Por essas razões é importante verificar se o genótipo ISKNV do *Megalocytivirus pagrus1* terá o mesmo efeito do que o RSIV na mesma linhagem celular e em diferentes espécies como a *O. niloticus*, pois mesmo sendo da mesma família eles podem ter mecanismos de ação diferentes nas células hospedeiras (He et al. 2001).

A literatura sobre o comportamento do ISKNV em células de linhagens fibroblásticas, em especial as BF-2, é bastante específica e pode variar dependendo dos estudos e das condições experimentais. Nakajima e Sorimachi (1994) afirmavam em seus estudos que apesar da BF-2 apresentar-se como uma opção viável para o isolamento de vírus, ainda seriam necessárias investigações

com outras variáveis, como o Polietileno glicol (PEG), para tentar evitar que a titulação viral diminua com o aumento de passagens da linhagem. No artigo destes autores, inúmeras linhagens foram testadas e duas (BF-2 e KRE- 3) apresentaram maior titulação viral de acordo com o teste TCID₅₀ (Tissue culture infectious dose), porém demonstraram uma perda de infectividade gradual conforme a passagem dos inóculos foram sendo realizadas. Apesar disso, outros estudos como Nishizawa et al. (2008) sugerem que a BF-2 seja viável para a replicação de outros vírus como os da família dos Nodavírus mesmo não apresentando uma infecção citolítica, ou seja, não causando ECP e não perdendo infectividade ao longo das passagens. Um recente estudo de Maganha (2022) foi realizado com sucesso para o isolamento do ISKNV em células BF-2, observando efeito citopático e confirmando a presença do vírus por PCR convencional e microscopia eletrônica. Outros estudos indicam que em linhagens fibroblásticas o ISKNV pode começar a induzir ECP após cerca de 3 a 5 passagens (Dong et al. 2008; Kawato et al. 2020). Guo et al. (2012) utilizaram linhagem celular de peixe mandarim MFF-1 para estudar os mecanismos de internalização do ISKNV mostrando que esse processo se dá por endocitose mediada por caveolinas. Entretanto, é importante esclarecer que o tempo e a intensidade dos ECP podem variar entre diferentes isolados do ISKNV e até mesmo entre diferentes estudos conduzidos com a mesma linhagem celular. Fatores como a carga viral inicial, as condições de cultivo e a resposta celular podem influenciar esses resultados.

Em nossa pesquisa, não observamos ECP visíveis nas células BF-2, mesmo após 21 dias de consecutivas inoculações (terceira Passagem). As cargas virais iniciais foram em média de 27,0 para Ilha Solteira e 29,63 para Paranapanema. A presença do vírus foi confirmada por qPCR, mas a ação citolítica não foi observada. Alguns autores sugerem que especificamente este tipo de megalocitívirus obtenha maior viabilidade de isolamento com ECP em células GF (Grunt Fin cell), derivada de tecido da barbatana do peixe grunhido azul (*Haemulon sciurus*) e amplamente utilizada em estudos de isolamento viral e de caracterização de ISKNV (Jitrakorn et al. 2020).

Koda et al. (2018) investigaram a infecção dos vírus TSGIV (Three spot gourami iridovirus) e SACIV (South American Cichlid iridovirus) pertencentes ao clado 2 de TRBIV (Go et al. 2016) em células de GF. As células apresentaram ECP apenas 96 horas após a primoinoculação. Outros autores também utilizaram recentemente essas células como meio de se estudar a interação do ISKNV com a célula hospedeira como é o caso de Chen et al. (2020) e Chen et al. (2022). Foi observado que o ISKNV pode induzir as células a apoptose via Fas e Bax e desencadear sinais de estresse mediados por ROS (espécies reativas de oxigênio).

Go et al. (2016) observaram arredondamento e o aumento de células ocasionais quando investigaram genótipos de *Megalocytivirus pagrus1* isolados em BF-2. Apesar disso, Oh et al. (2016) trabalhando com o mesmo material afirmam que passagens sucessivas e prolongadas podem também acarretar a diminuição de infectividade, mesmo utilizando esta linhagem. Mesmo com o estabelecimento da GF como principal linhagem utilizada para estudo de Megalocitivirus ainda há um grande esforço de instituições em produzir novas linhagens primárias que sejam aptas a infecções desses patógenos. Linhagens como CPB (Fu et al. 2015), MFF-1 (Dong et al. 2008) e SKF- 9 (Kawato et al. 2017), todas se mostraram opções viáveis para a infecção de ISKNV nos respectivos estudos. Fu et al. (2015) produziram linhagens primárias a partir de diferentes tecidos de *S. chuatsi*, porém apenas as células provenientes do cérebro (CPB) se demonstraram suscetíveis ao patógeno. Liu et al. (2019) investigaram o isolamento do ISKNV nessa linhagem e obtiveram sucesso, porém não foi investigada a titulação viral contínua em sucessivas passagens de subcultivo.

A linhagem SKF-9 oriunda de *Oplegnatus punctatus* demonstrou uma alta produção viral e não foi observada uma diminuição de patogenicidade após as passagens virais. MFF-1 foi a primeira linhagem oriunda de *Siniperca chuatsi* e que também apresentou grande número de partículas virais durante a infecção com Megalocitivirus. Mesmo assim, a linhagem GF continua sendo uma das principais ferramentas utilizadas nos estudos de investigação dos mecanismos de ação de Megalocytivirus e o isolamento do ISKNV continua sendo um desafio. Essas linhagens celulares não são comercializadas por instituições como a

ATCC®), o que dificulta a obtenção de linhagens mais apropriadas para estudar determinados vírus. Por isso, é importante que haja colaboração de laboratórios que obtenham sucesso na produção dessas novas linhagens primárias suscetíveis a certos patógenos, para que uma maior diversidade de estudos sejam conduzidos para caracterizá-los.

Concluimos que o isolamento do *Megalocyttivirus pagrus1* (genótipo ISKNV) é viável em linhagem fibroblástica BF-2, mas não houve evidências morfológicas de padrões citopáticos que pudessem ser reportados *in vitro*. Estudos adicionais serão necessários para confirmar nossas observações.

5. Agradecimentos

Agradecemos especialmente aos laboratórios de Higiene Zootécnica (FZEA - USP) e Viroses de Bovídeos (Instituto Biológico - SAA) e à Dra. Márcia Catroxo (Instituto Biológico - SAA) e Dra. Alessandra Popov pelo apoio logístico e direcionamento científico. Também somos gratos às agências de fomento CAPES e FAPESP (2021/13051-9) pelo apoio financeiro.

6. Referências Bibliográficas

Chao, C.B.; Chen, C.Y.; Lai, Y.Y.; Lin, C.S.; Huang, H.T. 2004. Histological, ultrastructural, and in situ hybridization study on enlarged cells in grouper *Epinephelus* hybrids infected by grouper iridovirus in Taiwan (TGIV). *Dis Aquat Organ* 58: 127-142.

Chen, K.W.; Chiu, H.W.; Chiu, Y.W.; Wu, J.L.; Hong, J.R. 2020. EPA and DHA can modulate cell death via inhibition of the Fas/tBid-mediated signaling pathway with ISKNV infection in grouper fin cell line (GF-1) cells. *Fish Shellfish Immunol* 97: 608-616.

Chen, P.H.; Hsueh, T.C.; Wu, J.L.; Hong, J.R. 2022. Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus (ISKNV) Triggers Mitochondria-Mediated

Dynamic Interaction

Signals via an Imbalance of Bax/Bak over Bcl-2/Bcl-xL in Fish Cells. *Viruses* 14: 922-937.

Claytor, S.C.; Subramaniam, K.; Landrau-Giovannetti, N.; Chinchar, V.G.; Gray, M.J.; Miller, D.L.; Mavian, C.; Salemi, M.; Wisely, S.; Waltzek, T.B. 2017. Ranavirus phylogenomics: Signatures of recombination and inversions among bullfrog ranaculture isolates. *Virology* 511: 330-343.

Dong C, Shuang F, Weng S & He J. 2014. Cloning of a new fibroblast cell line from an early primary culture from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) fry for efficient proliferation of megalocytiviruses. *Cytotechnology* 66: 883–890.

Dong, C.; Weng, S.; Shi, X.; Xu, X.; Shi, N.; He, J. 2008. Development of a mandarin fish *Siniperca chuatsi* fry cell line suitable for the study of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Virus Res.* 135: 273-281.

Figueiredo, H.C.P.; Tavares, G.C.; Dorella, F.A.; Rosa, J.C.C.; Marcelino, S.A.C.; Pierezan, F.; Pereira, F.L. 2021 First report of infectious spleen and kidney necrosis virus in Nile tilapia in Brazil. *Transbound emerg dis* 69: 3008–3015.

Ferreira, C.M.; Subramaniam, K.; Sousa, R.L.M.; Tavares, L.S.; Corrêa, T.C.; Waltzek, T.B. 2021. Genomic sequencing of a frog virus 3 strain from cultured American bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil. *Arch Virol* 166: 1961-1964.

Fu, X.; Li, N.; Lai, Y.; Luo, X.; Wang, Y.; Shi, C.; Huang, Z.; Wu, S.; Su, J. 2015. A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi*: development and characterization. *J Fish Biol* 86: 32-45.

Fusianto, C.K.; Hick, P.M.; Murwantoko; Herlambang, A.; Whittington, R.J.; Becker, J.A. 2021. Outbreak investigation attributes Infectious spleen and kidney necrosis virus as a necessary cause of a mortality epidemic in

farmed grouper (*Epinephelus* spp.) in Bali, Indonesia. *Aquac Rep* 20: 100723.

Giulietti, A.; Overbergh, L.; Valckx, D.; Decallonne, B.; Bouillon, R.; Mathieu, C. 2001. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods* 25(4): 386-401.

Go, J.; Waltzek, T.B.; Subramaniam, K.; Yun, S.C.; Groff, J.M.; Anderson, I.G.; Chong, R.; Shirley, I.; Schuh, J.C.; Handlinger, J.H.; Tweedie, A.; Whittington, R.J. 2016. Detection of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) and turbot reddish body iridovirus (TRBIV) from archival ornamental fish samples. *Dis Aquat Org* 122: 105-123.

Guo, C.J.; Wu, Y.Y.; Yang, L.S.; Yang, X.B.; He, J.; Mi, S.; Jia, K.T.; Weng, S.P.; Yu,

X.Q.; He, J.G. 2012. Infectious spleen and kidney necrosis virus (a fish iridovirus) enters Mandarin fish fry cells via caveola-dependent endocytosis. *J Virol* 86: 2621- 2631.

He, J.G.; Deng, M.; Weng, S.P.; Li, Z.; Zhou, S.Y.; Long, Q.X.; Wang, X.Z.; Chan,

S.M. 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology* 291: 126-139.

He, J.G.; Wang, S.; Zeng, K.; Huang, Z.; Chan, S.M. 2001. Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. *J Fish Dis.* 23: 219-222.

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 Pathol* 27: 19-27.

Jitrakorn, S.; Gangnonngiw, W.; Bunnontae, M.; Manajit, O.; Rattanarojpong, T.; Chaivisuthangkura, P.; Dong, H.T.; Saksmerprome, V. 2020. Infectious cell culture system for concurrent propagation and

purification of Megalocytivirus ISKNV and nervous necrosis virus from Asian Sea bass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 520: 734931.

Kawato, Y.; Yamashita, H.; Yuasa, K.; Miwa, S.; Nakajima, K. 2017. Development of a highly permissive cell line from spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) for red sea bream iridovirus. *Aquaculture* 473: 291-298.

Kawato, Y.; Mohr, P.G.; Crane, M.S.T.J.; Williams, L.M.; Naeve, M.J.; Cummins,

D.M.; Daernley, M.; Cramer, S.; Holmes, C.; Hoad, J.; Moody, N.J.G. 2020. Isolation and characterisation of an ISKNV-genotype megalocytivirus from imported angelfish *Pterophyllum scalare*. *Dis Aquat Org* 140: 129-141.

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* 3:18(2): e0281292.

Koda, S.A.; Subramaniam, K.; Francis-Floyd, R.; Yanong, R.P.; Frasca, S.J.R.; Groff, J.M.; Popov, V.L.; Fraser, W.A.; Yan, A.; Mohan, S. Waltzek, T.B. 2018. Phylogenomic characterization of two novel members of the genus Megalocytivirus from archived ornamental fish samples. *Dis Aquat Organ* 130: 11-24.

Kurita, J.; Nakajima, K. 2012. Megalocytiviruses. *Viruses* 4 521-538.

Li, Z.; Yang, L.; Wang, J.; Shi, W.; Pawar, R.A.; Liu, Y.; Xu, C.; Cong, W.; Hu, Q.; Lu, T.; Xia, F.; Guo, W.; Zhao, M.; Zhang, Y. 2010. β -Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunol* 29(1): 89-93.

Liu, L.; Yu, L.; Fu, X.; Lin, Q.; Liang, H.; Niu, Y.; Li, N. 2019. First report of

megalocytivirus (*iridoviridae*) in cultured bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, in China. Microb Pat 135: 103617

Luft, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. J Biophys Biochem Cytol. 1961 Feb;9(2):409-14. doi: 10.1083/jcb.9.2.409. PMID: 13764136; PMCID: PMC2224998.

Nakajima, K.; Sorimachi, M. 1994. Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. Fish Pathol 29: 29-33.

Nicolson, C.; Major, D.; Wood, J.M.; Robertson, J.S. 2005. Generation of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. Vaccine 23: 2943-2952.

Nishizawa, T.; Kokawa, Y.; Wakayama, T.; Kinoshita, S.; Yoshimizu, M. 2008. Enhanced propagation of fish nodaviruses in BF-2 cells persistently infected with snakehead retrovirus (SnRV). Dis Aqual Org 79: 19-25.

Oh, S.Y.; Nishizawa, T. 2016 Multiple Passages of Grunt Fin Cells Persistently Infected with Red Seabream Iridovirus (RSIV) at 15°C or 30°C to Yield Uninfected Cells. J Aquat Anim Health 28: 214-221.

Paz, D.J.F. 2023. Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) spillover from naturally infected tilapia to native free-living fish. Dissertação (Mestrado em aquicultura). Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista. São Paulo.

Pereira, U.P.; Rocha, F.E.P.; Ferrari, N.A.; Favero, L.M.; Mainardi, R.M.; Silva, M.B.; Alfieri, A.A.; Viadanna, P.H.O.; Waltzek, T.; Dall Agnol, A.M. 2024. Primeiro relato do vírus da necrose infecciosa do baço e do rim (ISKNV) em dois ciclídeos nativos cultivados no Brasil. Semina Ciênc Agrár 45: 239–250

Ramírez-Paredes, J.G.; Paley, R.K.; Hunt, W.; Feist, S.W.; Stone, D.M.; Field, T.R.; Haydon, D.J.; Ziddah, P.A.; Nkansa, M.; Guildler, J.; Gray, J.; Duodu, S.; Pecku, E.K.; Awuni, J.A.; Wallis, T.S.; Verner-Jeffreys, D.W. 2021. First

detection of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) associated with massive mortalities in farmed tilapia in Africa. *Transbound Emerg Dis* 68(3): 1550-1563.

Sah Putra, B.; Hick, P.M.; Hall, E.; Whittington, R.J.; Khairul, R.; Becker, J.A. 2020. Prevalence of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), nervous necrosis virus (NNV) and ectoparasites in juvenile *Epinephelus* spp. farmed in Aceh, Indonesia. *Pathogens* 9: 578-595.

Sukenda, S.; Gardenia, L.; Zairin, M.; Lusiastuti, A.; Alimudin, A. 2020. Identification of giant gourami iridovirus (GGIV): a new infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) from natural outbreak in cultured *Osphronemus goramy*. *Aquaculture International*: 3: 1069-1082.

Sykes, J.E.; Rankin, S.C. 2014. Isolation in Cell Culture. *Canine and Feline Infectious Diseases* 2-9.

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. *Arch Virol* 152: 763-773

Weber, E.S.^{3rd}.; Waltzek, T.B.; Young, D.A.; Twitchell, E.L.; Gates, A.E.; Vagelli, A.; Risatti, G.R.; Hedrick, R.P.; Frasca, S.Jr. 2009. Systemic iridovirus infection in the Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni* Koumans 1933). *J Vet Diagn Invest* 21: 306-320.

CAPÍTULO 2

Utilização da radiação ionizante como alternativa sustentável na esterilização de equipamentos para cultivo celular

Resumo

O cultivo celular é uma técnica muito utilizada em pesquisas permitindo estudos de crescimento celular, avaliação da citotoxicidade de fármacos, produtos químicos e estudos virais. É uma ferramenta promissora que revolucionará não apenas a pesquisa biomédica, mas também a produção de terapias personalizadas e alternativas sustentáveis ao uso de animais. Apesar disso, ainda é um método caro que enfrenta sérios problemas de contaminação intercelular e infecções por fungos, bactérias e vírus. O objetivo desta pesquisa foi verificar a eficiência do tratamento por raios gama na esterilização de equipamentos não autoclaváveis usados em cultivos celulares. Adicionalmente, fizemos algumas inferências sob o custo deste procedimento. Para tanto, frascos de 25 cm², já utilizados em rotina laboratorial, foram lavados, secos em estufa, embalados em sacos plásticos individuais e encaminhados para serem irradiados e esterilizados com raios gama. A dose aplicada nos materiais foi de 20 kGy, utilizando uma taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹. O delineamento experimental consistiu em três tratamentos com três réplicas simultâneas, a saber: T1 - Frascos controle; T2 - Frascos novos esterilizados e T3 - Frascos reutilizados irradiados. Os frascos foram cultivados com células de peixe Bluegill Fry (BF-2) e acompanhados por 12 dias com subcultivos a cada quatro dias, totalizando três passagens cada. Observamos apenas uma garrafa contaminada no 11^o dia, mas não houve diferença de crescimento celular nos diferentes tratamentos. Nossos resultados evidenciam que a utilização de raios gama na esterilização de equipamentos não autoclaváveis é eficiente, e que seu custo é altamente competitivo financeiramente, contribuindo para a diminuição do passivo ambiental gerado pelos procedimentos.

Palavras-chave: Raios Gama; Reutilização; Contaminação laboratorial; Irradiação por Cobalto-60

1. Introdução

O cultivo celular (Cc) é uma técnica que revolucionou a pesquisa biomédica e biotecnológica. Sua história remonta ao início do século XX quando cientistas começaram a tentar manter células fora do corpo humano ou animal, em ambientes controlados (Rodríguez-Hernandez et al., 2014; Soleymani, et al., 2024). É uma técnica muito utilizada em pesquisas, permitindo estudos de crescimento celular, avaliação da citotoxicidade de fármacos e outras substâncias, estudos virais, criação de vacinas e identificação dos papéis de certos genes na manutenção de infecções (Segeritz et al., 2017). Acredita-se que em breve a tecnologia de Cc revolucionará não apenas a pesquisa biomédica, mas também a produção de terapias personalizadas e alternativas sustentáveis oferecendo soluções mais seguras, eficientes e escaláveis para os desafios globais de saúde e alimentação (Soleymani, et al., 2024). Apesar disso, ainda é um método caro que enfrenta sérios problemas de contaminação intercelular e infecções por fungos, bactérias e vírus (Weiskirchen et al., 2023).

Autenticidade das linhagens celulares e contaminações são uma das principais dificuldades enfrentadas por cientistas no manejo de linhagens celulares em laboratório (Roth et al., 2020; Horbach e Halffman, 2017). Freshney (2011) reporta como alternativas para combater esse problema a utilização de fluxo laminar para o manejo das células, uso de antibióticos e antimicóticos junto com o meio de cultivo. O soro fetal bovino (SFB), principal aditivo para crescimento celular, ainda não tem similares sintéticos. Dependendo da origem, pode conter diferentes quantidades de suplemento hormonal, fatores de crescimento, conteúdo viral e endotoxinas (Rodríguez-Hernandez et al., 2014; Mojica-Henshaw et al., 2013; Weiskirchen et al., 2023). Sendo assim é prática usual dos laboratórios inativá-lo e monitorá-lo uma vez que apresentam composição variada de acordo com sua origem.

Diversos guias de boas práticas em laboratórios de cultivo celular já foram elaborados (Paimes et al., 2022). Isso ajuda pesquisadores com menos

experiência a delinear os métodos que serão utilizados e até na logística de montagem de um laboratório novo.

Para evitar as contaminações, vários laboratórios trabalham com materiais plásticos estéreis que são descartados logo após o primeiro uso. Além do alto custo isso gera um grande passivo ambiental. O uso de autoclavagem é uma opção, mas nem todos os insumos podem passar por esse processo (Weiskirchen et al., 2023). Uma alternativa ao uso de altas temperaturas para esterilização destes materiais é o uso da radiação eletromagnética. Existem dois tipos principais de radiação: 1) radiação ionizante, que tem energia suficiente para ionizar átomos ou moléculas (retirar elétrons), o que pode causar danos biológicos, como são os raios gama, raios X e feixe de elétrons; 2) radiação não ionizante, que tem energia insuficiente para ionizar átomos, como as micro-ondas e a radiação de rádio.

A irradiação ou processamento de materiais por Cobalto-60 é um método eficaz e usado há mais de 50 anos pela indústria médica (Santos, 2017). Neste processo, os materiais são expostos à radiação emitida por átomos de Cobalto-60, um isótopo radioativo artificial. O Cobalto-60 emite radiação gama, que é um tipo de radiação ionizante de alta energia utilizada em diversas aplicações, entre elas, a esterilização de materiais. A radiação penetra profundamente os materiais com um efeito biocida. Esse processo não torna os materiais irradiados radioativos, mas pode alterar propriedades químicas e biológicas dos objetos tratados dependendo do objetivo (IAEA, 2004). A dose de radiação aplicada é cuidadosamente controlada, dependente do propósito específico do tratamento e é medida em Grays (Gy). Esse método é extremamente eficiente e largamente utilizado por sua capacidade de esterilização profunda e preservação de materiais sem necessidade de aquecimento ou produtos químicos.

Dentro dos tipos de radiação ionizante o Cobalto-60 é o mais utilizado por sua facilidade de acesso, qualidade e capacidade de não solubilizar em água, o que não gera passivo ambiental. As doses recomendadas para

esterilização de materiais hospitalares estão entre 15 e 30 kGy (IAEA, 2005; SANTOS, 2017).

O objetivo desta pesquisa foi verificar a eficiência do tratamento por raios gama na esterilização de equipamentos não autoclaváveis usados em cultivos celulares.

2. Material e Métodos

O experimento foi realizado no laboratório de cultivo celular do Instituto de Pesca - São Paulo/SP. Frascos de 25 cm² e 75 cm² já utilizados em rotina laboratorial foram lavados com Extran®, enxaguados persistentemente, secos em estufa a 40°C, embalados em sacos plásticos individuais e encaminhado para o Irradiador Multipropósito de Cobalto-60 do CETER/IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) para serem esterilizados. A dose aplicada nos materiais foi de 20 kGy, utilizando uma taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹.

No laboratório de cultivo celular, realizamos uma limpeza com Virkon diluído a 1% no chão e limpamos todas as bancadas, fluxo laminar e estufa com álcool 70%. Para a estufa e o fluxo laminar também foram realizadas a esterilização com 15 minutos de luz ultravioleta (UV) após a limpeza. O fluxo laminar era esterilizado todas as vezes que era utilizado. Optamos também pela utilização de máscaras, luvas, toucas, propés e aventais destinados para uso estrito no laboratório de cultivo.

O delineamento experimental consistiu em três tratamentos com três réplicas simultâneas, a saber: T1 - Frascos controle; T2 - Frascos novos esterilizados e T3 - Frascos reutilizados irradiados. Inicialmente utilizamos um frasco de 125 cm² preparado antecipadamente com monocamada de células de peixe Bluegill Fry (BF-2) importadas da ATCC® (American Type Culture Collection), de origem fibroblástica. As células foram mantidas em solução contendo 90% de meio Eagle (Sigma®) e 10% de soro fetal bovino (SFB)

(Cultilab®). Quando a confluência nesta garrafa padrão atingiu 80% (número total de células de 2×10^6), iniciamos a experimentação. Subcultivamos o frasco padrão para seis frascos de 25 cm² sendo três desses frascos novos esterilizados (T2) e outros três frascos reutilizados e esterilizados por irradiação com Cobalto-60 (*i.e.* raios gama - T3). O experimento teve a duração de 12 dias com subcultivos a cada quatro dias, ou seja, três passagens.

Durante toda a experimentação não foram adicionados antibióticos ou antibióticos às células. O subcultivo foi realizado retirando o meio dos frascos, lavando-os com solução tampão fosfato (PBS) e em seguida adicionado 1 mL de solução de tripsina/EDTA para descolamento das células. Após esse processo foi feita uma homogeneização com meio Eagle 90% + SFB 10% para neutralizar a ação da tripsina. Os novos frascos foram subcultivados com um terço do produto dessa homogeneização (1^a passagem). Após quatro dias da primeira passagem, o procedimento foi repetido sucessivamente até o fim do período experimental. Diariamente cada frasco foi avaliado de forma individual, em microscópio óptico de inversão (Nikon®), para acompanhamento do crescimento celular e investigação de possíveis contaminações.

3. Resultados

As células dos tratamentos T1 (controle), frascos novos esterilizados (T2) e Frascos reutilizados irradiados (T3), não apresentaram diferenças quanto ao crescimento (Figura 1). A confluência média de cada frasco nas sucessivas passagens foi de 80%. No 11^o dia observamos uma contaminação por leveduras em uma das réplicas do T3 (irradiado). Essas contaminações são geralmente atribuídas a erros de manipulação. Apesar da contaminação, as células continuaram a crescer por mais um dia atingindo 90% de confluência e então foram descartadas. Em nenhuma outra garrafa foi observado qualquer indício de contaminação por fungos ou bactérias.

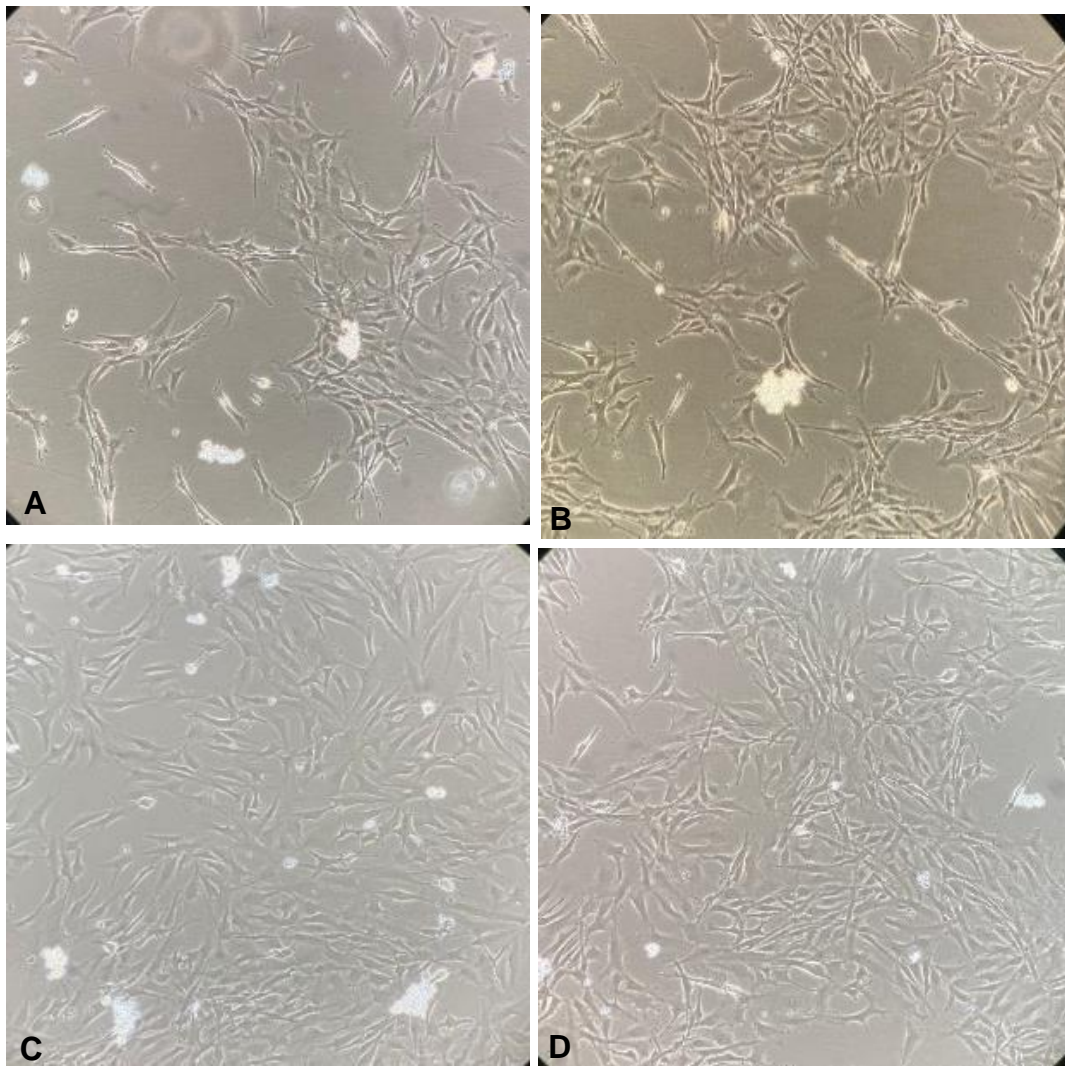


Figura 1 - Fotomicrografia de células de linhagem fibroblásticas de peixe (BF-2) em cultivo celular. A e B - Frasco novo esterilizado 4 dias. C e D - Frasco irradiado 4 dias. Aumento de 200x.

Para as inferências sobre o custo da irradiação tomamos por base o valor cobrado pelo Irradiador Multipropósito de Cobalto-60 do CETER/IPEN do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)/São Paulo, em junho de 2023 e os preços médios praticados por fornecedores na mesma cidade. Nos processos de irradiação, os valores são cobrados por volume, dose e tempo de exposição. O preço de 1m³ cobrado para a irradiação foi de US\$ 396,83¹ com o dólar na época cotado a R\$ 5,04.

¹ Fonte: Banco Central em 01/06/2023

No presente estudo, utilizamos frascos de 25 cm² (0,00012 m³), a um custo médio de US\$ 1,49 por frasco novo. Levando-se em consideração o volume e os preços praticados no fornecimento de frascos de cultivo celular e nos processos de irradiação por raios gama, cada frasco de 25 cm² irradiado tem um custo médio de US\$ 0,05.

4. Discussão

O grande avanço das técnicas de Cc ocorreu com a descoberta das células HeLa em 1951. Essas células foram as primeiras células humanas a serem cultivadas com sucesso por longos períodos em laboratório (Ivanković et al., 2007). A partir dessa descoberta, essa técnica evoluiu para se tornar uma ferramenta essencial na pesquisa científica sendo amplamente utilizado em estudos de toxicologia, desenvolvimento de fármacos, biotecnologia, entre outras (Rodriguez-Hernandez et al., 2014). Atualmente, os Cc tornaram-se uma das principais ferramentas no estudo de vírus e na replicação destes para criação de vacinas sem a necessidade de experimentações em animais (Lindenbach et al., 2005; Leland et al., 2007).

No entanto, apesar de seu potencial promissor, a cultura de células *in vitro* enfrenta desafios consideráveis. Contaminações por fungos, bactérias, leveduras e micoplasmas são um problema recorrente que pode comprometer os experimentos, exigindo controle rigoroso de esterilidade nos laboratórios (Coecke et al., 2005, Zhi et al.; 2010; Oliveira et al., 2013). Além disso, o Cc é uma técnica de alto custo. Os meios de cultura utilizados, compostos por nutrientes específicos, fatores de crescimento e condições otimizadas, são de alto valor de mercado e requerem reposição periódica. Outro aspecto preocupante é o impacto ambiental gerado, uma vez que a manutenção das culturas celulares depende do uso extensivo de materiais plásticos descartáveis, como placas de cultura, pipetas e frascos. Isso gera um passivo ambiental significativo, contribuindo para a geração de resíduos plásticos (Kibria et al. 2023). Em contrapartida, há uma crescente

preocupação com o uso de plásticos descartáveis na ciência e este assunto tem ganhado visibilidade nos últimos anos, especialmente no contexto da sustentabilidade e da redução de resíduos. (Lopez et al., 2017; Kibria et al. 2023). Reduzir, reutilizar e reciclar materiais, especialmente consumíveis, é prática desejável e recomendada em diferentes locais inclusive laboratórios científicos.

Neste sentido realizamos o presente estudo com o objetivo de colaborar com a redução do impacto ambiental gerado pelos laboratórios de Cc. Nossos resultados evidenciam que a utilização de raios gama na esterilização de equipamentos não autoclaváveis é eficiente e pode ser uma valiosa solução para diminuição de resíduos plásticos. Os custos da irradiação de materiais de cultivo foram aproximadamente 30 vezes mais baratos do que o custo da compra de materiais novos nesta experimentação. Entretanto, ainda são necessários estudos adicionais para determinar o número específico de reciclagens para garantir a integridade dos materiais e a viabilidade econômica do procedimento de irradiação.

É importante também destacar que irradiadores particulares apresentam um custo maior para o serviço de irradiação. Deste modo, a irradiação ainda continua sendo uma opção muito viável, barata e mais sustentável se comparada a compra de materiais novos para o cultivo celular.

Na literatura já existem experimentos que investigam a possibilidade de se usar a radiação por raios gama para esterilização. Mangutova et al. (2016) aplicaram essa técnica na tentativa de esterilizar meios de cultura diversos que foram contaminados artificialmente com vírus e bactérias. Seus resultados demonstram que a irradiação em dosagem até $3,0 \times 10^4$ Gy foi eficiente para livrar os meios desses organismos patogênicos sem danificar nível de pH, coloração e composição de proteínas e lipídeos. Além disso a reprodução das células em que se utilizou meios irradiados não diferiu das células cultivadas em meios não expostos.

Assim como outras técnicas biomoleculares, como PCR convencional e qPCR, que com o tempo foram aprimoradas e tornaram-se mais acessíveis e ambientalmente mais seguras, acredita-se que o Cc seguirá um caminho

semelhante. Com avanços tecnológicos contínuos, é esperado que novas abordagens reduzam os custos e aumentem a eficiência, ao mesmo tempo em que soluções mais sustentáveis e ecológicas sejam desenvolvidas para mitigar o impacto ambiental. Acreditamos que o futuro do Cc e da irradiação para esterilização de materiais plásticos é promissor, com o potencial de se tornar uma ferramenta ainda mais acessível e sustentável para as pesquisas científicas.

5. Agradecimentos

Agradecemos ao Irradiador Multipropósito de Cobalto-60 do CETER/IPEN do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) na pessoa do Dr. Pablo Vasquez e toda sua equipe e, as agências de fomento CAPES e FAPESP (2021/13051-9) pelo apoio financeiro.

6. Referencias Bibliográficas

Coecke, S.; Balls, M.; Bowe, G.; Davis, J.; Gstraunthaler, G.; Hartung, T.; Hay, R.; Merten, O.W.; Price, A.; Schechtman, L.; Stacey, G.; Stokes, W. 2005. Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim.* 33(3). 261-87.

Freshney, R.I. 2011. *Culture of Animal Cells: A manual of basics technique specialized applications.* John Wiley & Sons. 6th ED. Cap 4. 37-56.

Gamma Irradiators for Radiation Processing. 2004. International Atomic Energy Agency (IAEA). Disponível em: https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/37/081/37081743.pdf/. Acesso em out de 2024.

Gamma Irradiators for Radiation Processing. 2005. International Atomic

Energy Agency (IAEA). Disponível em: https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/37/081/37081743.pdf/. Acesso em out de 2024.

Horbach, S.P.J.M.; Halffman, W. 2017. The ghosts of HeLa: How cell line misidentification contaminates scientific literature. *PLoS One*. 12(10). e0186281.

Ivanković, M.; Cukusić, A.; Gotić, I.; Skrobot, N.; Matijasić, M.; Polancec, D.; Rubelj, I. 2007. Telomerase activity in HeLa cervical carcinoma cell line proliferation. *Biogerontology*. 8 (2). 163-72.

Kibria, M.G.; Masuk, N.I.; Safayet, R.; Nguyen, H.Q.; Mourshed, M. 2023. Plastic Waste: Challenges and Opportunities to Mitigate Pollution and Effective Management. *Int J Environ Res*. 17 (1). 20-57.

Leland, D.S.; Ginocchio, C.C. 2007. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev*. 20 (1). 49-78.

Lindenbach, B.D.; Evans, M.J.; Syder, A.J.; Wölk, B.; Tellinghuisen, T.L.; Liu, C.C.; Rice, C.M.; 2005. Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science*. 309 (5734). 623- 626.

Lopez, J.B.; Jackson, D.; Gammie, A.; Badrick, T. 2017. Reducing the Environmental Impact of Clinical Laboratories. *Clin Biochem Rev*. 38 (1). 3-11.

Mangutova, K.S.; Plotnikova, E.M.; Nikitin, A.I.; Nizamov, R.N.; Shuralev, E. 2016. Application of gamma ray techniques in cell culture medium sterilization. *International. J of Pharm Techn* 8(4): 24565-24571.

Mojica-Henshaw, M.P.; Morris, J.; Kelley, L.; Pierce, J.; Boyer, M.; Reems, J. A. 2013. Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy*. 15(12). 1458-1468.

Oliveira, T.F.P.; Fonseca, A.A.Jr.; Camargos, M.F.; Oliveira, A.M.; Cottorello,

A.C.P.; Ados, R.S.; Almeida, I.G.; Heinemann, M.B. 2013. Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. *Biologicals*. 41 (6). 407-414.

Pamies, D.; Leist, M.; Coecke, S.; Bowe, G.; Allen, D.G.; Gstraunthaler, G.; Bal-Price, A.; Pistollato, F.; Vries, R.B.M.; Hogberg, H.T.; Hartung, T.; Stacey, G. 2022.

Guidance document on Good Cell and Tissue Culture Practice 2.0 (GCCP 2.0). ALTEX 39: 30-70.

Rodríguez-Hernandez, C.M.; Garcia, S.E.T.; Sandoval, C.O.; Castillo, F.Y.R.; Muro, A.L.; González, F.J.A.; Barrera, A.L.G. 2014. Cell Culture: History, Development and Prospects. *Int J Curr Res Aca Rev*. 2. 188-200.

Roth, J.S.; Lee, T.D.; Cheff, D.M.; Gosztyla, M.L.; Asawa, R.R.; Danchik, C.; Michael, S.; Simeonov, A.; Klumpp-Thomas, C.; Wilson, K.M.; Hall, M.D. 2020. Keeping It Clean: The Cell Culture Quality Control Experience at the National Center for Advancing Translational Sciences. *SLAS Discov*. 25(5). 491-497.

Santos, P.S. 2017 Estudo e otimização dos parâmetros de processamento por radiação gama em escala industrial considerando fatores operacionais. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 92p.

Segeritz, C.P.; Vallier, L. 2017. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. 2016. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 151-172.

Soleymani, S.; Naghib, S.M.; Mozafari, M.R. 2024. An overview of cultured meat and stem cell bioprinting: How to make it, challenges and prospects, environmental effects, society's culture and the influence of religions. *J of Agric and Food Res*. 18. 101307. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101307>.

Weiskirchen S, Schröder SK, Buhl EM, Weiskirchen R. 2023. A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems. *Cells*. 12(5). 682.

Yan Zhi, Amy Mayhew, Natalie Seng, Garry B. Takle. 2010. Validation of a PCR

method for the detection of mycoplasmas according to European Pharmacopoeia section 2.6.7. Biologicals. 38. 232-237. Doi [10.1016/j.biologicals.2009.11.003](https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.11.003)

Silva, R. C.; da Silva, R. M.; Aquino, K. A. S. 2014. A Interação da Radiação Gama com a Matéria no Processo de Esterilização. Rev. Virtual Quim. 6. 1624-1641. Doi: 10.5935/1984-6835.20140105

Anexos



Figura 1 –Laboratório de Cultivo Celular do Instituto de Pesca (LCC-IP). A – Fase inicial de adaptação das instalações, com colocação de divisórias e “Pass Through” (seta). B – Instalação das conexões para transmissão de gás CO₂ para alimentação das incubadoras e isolamento das áreas limpa e cinza. C – Fluxos laminares da área limpa e área cinza. D – Equipe do projeto.



Figura 2 – Linhagem celular BF-2 (Bluegill Fry) importadas da ATCC (American Type Culture Collection), sendo recepcionada no laboratório de Cultivo Celular do Instituto de Pesca. A – Embalagens de transporte. B – Frasco com células (seta). C – Detalhe do microtubo com células congeladas. D. Armazenamento em botijão de nitrogênio líquido. (Dezembro/2022).

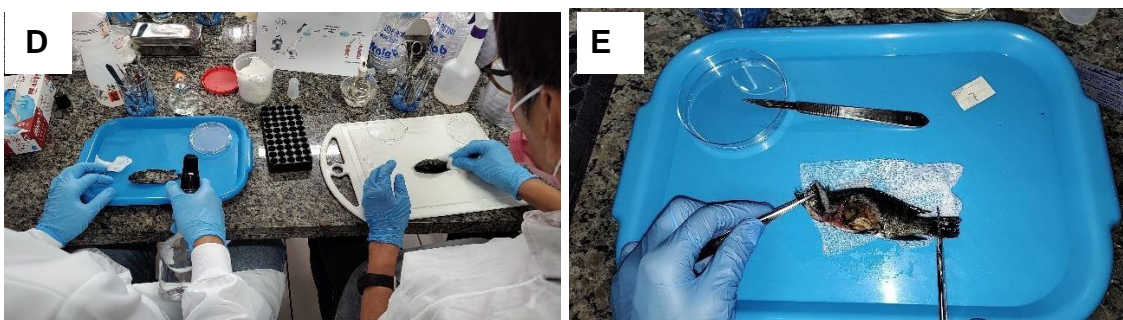


Figura 3 – Coleta de alevinos e formas jovens de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em Ilha Solteira/SP. A – Vista geral da entrada da Propriedade. B – Transporte dos peixes. C – Formas jovens de tilápias sendo eutanasiadas. D – Necrópsia. E – Detalhe da necrópsia.