RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 12/12/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIA PROFILÁTICA PARA CONTROLE DE *Streptococcus agalactiae* E *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis* niloticus), VACINADAS COM BACTERINAS EM VEÍCULO DE POLI (ÁCIDO LÁTICO)

Gabriel Conde

Médico Veterinário

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIA PROFILÁTICA PARA CONTROLE DE *Streptococcus agalactiae* E *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis* niloticus), VACINADAS COM BACTERINAS EM VEÍCULO DE POLI (ÁCIDO LÁTICO)

Gabriel Conde

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área: Medicina Veterinária Preventiva

2022

C745d

Conde, Gabriel

Desenvolvimento de estratégia profilática para controle de Streptococcus agalactiae e Aeromonas hydrophila em Tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus), vacinadas com bacterinas em veículo de PLA (ácido lático) / Gabriel Conde. -- Jaboticabal, 2023

116 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Marco Antonio de Andrade Belo

1. Adjuvantes imunologicos. 2. Bacterioses. 3. Contenção de riscos biológicos. 4. Biodegradação. 5. Materiais biomedicos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE. DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIA PROFILÁTICA PARA CONTROLE DE *Streptococcus agalactiae* E *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*), VACINADAS COM BACTERINAS EM VEÍCULO DE POLI (ÁCIDO LÁTICO)

AUTOR: GABRIEL CONDE
ORIENTADOR: MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO (Participaçao Virtual)
Departamento de Patologia Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS (Participaçao Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP -Jaboticabal

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participaçao Virtual)
Departamento de Clinica e Cirurgia Veterinaria / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. MARCELO APARECIDO CHINELATTO (Participaçao Virtual)
Departamento de Engenharia de Materiais / USP São Carlos/SP

Profa. Dra. KARINA CASTAGNOLLI MARTINS (Participaçao Virtual)
Depto. Ciências Biológicas / UNIARA Araraquara/SP

Karina Castagnolli Martins

Jaboticabal, 12 de dezembro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gabriel Conde nasceu na cidade de Araraquara, no dia 19 de novembro de 1987, filho de Silvana Conde e Carlos Alberto Melli. Realizou sua graduação em Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP, campus Luiz Meneguel, Bandeirantes-PR, concluindo-a em julho de 2013. Foi bolsista pela Fundação Araucária (2012-2013), desenvolvendo projeto intitulado: Tamanho do útero e indução de ciclicidade ovariana em novilhas nelore pré-púberes tratadas com progesterona, sob orientação do Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros. Realizou estágio curricular na empresa In Vitro Brasil S/A. Na mesma empresa foi bolsista TT3 FAPESP no programa PIPE (2013-2014), desenvolvendo projeto intitulado: Desenvolvimento de ferramentas genômicas para a seleção de vacas com alta fertilidade. Em 2014 ingressou como funcionário da mesma empresa desenvolvendo atividades de avaliação ginecológica, protocolo hormonal, diagnóstico gestacional, sexagem fetal e transferência de embriões em tempo fixo. Atuou em grandes projetos no Brasil, projeto Marfrig+ e na Rússia. Em março de 2017 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV/Unesp Câmpus de Jaboticabal, na área de Clínica Médica Veterinária como bolsista CNPq, sob orientação do Prof. Guilherme de Camargo Ferraz, obtendo o título de mestre em 2019. No mesmo ano início o Doutorado na mesma instituição na área de Medicina Veterinária Preventiva como bolsista Capes, sob orientação do Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo.

“Depois de algum tempo você aprende que, ou você controla seus atos, ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco, ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem, pelo menos, dois lados. Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as consequências. Aprende que paciência requer muita prática”.

William Shakespeare

Dedico esse trabalho a Albertina Simões Romano, Liocrides Romano e Edmilson Luis Laurini (*in memoriam)* por forjarem em mim o que havia de melhor neles. Também dedico a Stela Basso Montoro, que durante todos esses anos ao meu lado, me apoiou em todas as minhas escolhas pessoais e profissionais e sempre me ajudou a conquistar o que almejei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos animais, cavalos, ratos e peixes que possibilitaram as pesquisas de mestrado e doutorado.

Agradeço ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Programa de Excelência Acadêmica-PROEX) e a pós-graduação da FCAV- Unesp pela concessão de bolsa de doutorado para a execução do projeto (Processo n° 88887.339283/2019-00, CAPES).

Agradeço a minha querida mãe Silvana Conde por nunca ter poupado esforços, para me proporcionar tudo o que há de melhor, possibilitando minha formação pessoal e profissional. Tudo isso associado ao amor que carinho que sempre teve comigo me fizeram chegar aonde cheguei, mais especificamente, onde sempre quis estar. Muito obrigado, te amo !

Ao meu irmão Bruno Conde que sempre me apoiou e sempre esteve ao meu lado em todas as minhas decisões. Amo você!

Aos meus avós Irineu e Neuza, meus tios, Júnior, Patricia, Emerson, Cássio, Adriana, Dani e meus primos, Marina, Mauricio, Murilo e Henrique que me ensinaram que, trabalhar com dedicação e responsabilidade, trazem bons frutos. Compreenderam meus momentos de ausência quando trabalhava na iniciativa privada no mestrado e no doutorado. Participaram de todas as etapas da minha vida. Nunca me deixaram desistir diante de inúmeros obstáculos, me aconselharam nos momentos difíceis, e sempre me deram toda a estrutura possível para eu alcançar todos os meus objetivos. Obrigado por acreditarem e apostarem em mim.

Rui Laurini, Eliana Laurini, Alexandre Laurini, Bruna Laurini e Carla Laurini, estamos juntos há mais de 20 anos e sempre estaremos. Ao longo deste tempo vocês me deram todo o suporte para eu chegar até aqui. Não existem palavras para agradecer. Vocês são incríveis, amo vocês!

Elvio Castanho, Lucilene Castanharo, Carla Castanho, Eduardo Castanho e Mayara Castanharo, pelos mais de 20 anos de amizade. Nesse tempo sempre me apoiaram em tudo que fiz, o que possibilitou chegar até aqui. Não tenho palavras pra agradecer a tantos momentos incríveis que sempre passamos e passaremos. Amo vocês!

A Rolando Montoro, Rosangela Montoro, Victor Montoro, Milena Montoro, Rafaela Perone, Bruno Perone, Manuela Perone, por terem me acolhido. Hoje somos uma família! Muito obrigado por toda ajuda e ensinamentos, por me fazerem crescer e me apoiarem nas minhas escolhas.

Aos meus irmãos da Rep. Colina Verde, parte importantíssima do meu crescimento pessoal e profissional. Desde a época de república em Bandeirantes até hoje. Não deixamos de manter contato e sempre que podemos nos reunimos. Vocês são parte fundamental da minha vida.

Agradeço a todos os funcionários da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV Unesp, por se preocuparem em proporcionar o melhor para que possamos realizar nossas atividades de forma mais fácil. Em especial a Márcia e ao Sr. Milton por toda ajuda durante o doutorado, principalmente com os bezerros, pelas conversas no departamento. Obrigado pela amizade de vocês.

Aos Professores da FCAV-Unesp, por se preocuparem não só em nos ensinar, mas se preocuparem em sermos cada vez mais humanos. Admiro a cada um de vocês!

Nathan Cruz, Helena agradeço a amizade. Por nos ajudar com o citometria dos experimentos aos sábados, domingos e feriados. Agradeço os conselhos, as conversas, todo ensinamento e ajuda que me proporcionaram.

A Henriette Moranza (Tre), muito obrigado por me ajudar prontamente. Por sermos mais que amigos, irmãos. Os conselhos, as risadas, a ajuda a escrever meu primeiro artigo. A todos os momentos bons e ruins que passamos juntos.

Agradeço a Paula Dias por toda ajuda com os biomateriais, as dúvidas que surgiam, e principalmente a amizade. Muito obrigado. Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Aparecido Chinelatto por abrir as portas do seu laboratório e nos ajudar cedendo os biomateriais utilizados em mais essa pesquisa, e principalmente com confiar em mim. Muito obrigado!

Ives, Susana, Leticia, Mayumi, Camila, Herlen, Brenda agradeço imensamente a amizade, a imensa ajuda que me deram na condução dos experimentos, por me ensinar a trabalhar com peixes e por confiarem em mim e permitir que pudesse ajudá-las também. Muito obrigado !

Thalles Ruiz, Luiz Falleiros e Prof. Sebastião Taboga, agradeço imensamente a vocês por me permitirem utilizar o Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises – IBILCE para todas as análises de microscopia, histoquímica e imuno-histoquimica dos dois trabalhos aqui escritos. Pela paciência em me ensinar muito e por toda ajuda e preocupação que tiveram durante e depois das análises. Muito obrigado !

Aos grandes amigos Douglas Franciscato, Guilherme Motta, Felipe Sanches, Ana Carolina Silva, Guilherme Gorni, Inaê Regatieri, João de Souza, Karina Castagnolli, Mariana Fonseca, Nara Bernardi, Aline Vaz, Bruno Vieira, Fernanda Martinato, Fabiano Neves e Aline muito obrigado pela amizade, companheirismo, pelas conversas produtivas e improdutivas que temos. Agradeço por fazerem parte desse momento.

Adilson, Ju e Duda Machioni agradeço por todos os momentos, pelos conselhos, preocupações, por toda ajuda nessa etapa. Vocês são sensacionais. Muito obrigado !

Ao Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo, meu orientador. Não tenho como agradecer por ter acreditado em mim, acreditado que conseguiríamos elaborar o dispositivo vacinal e que funcionaria. Agradeço por esses 4 anos de ensinamentos, conselhos, pela amizade e companheirismo. Não tenho palavras para agradecer !

Além da dedicatória os agradecimentos não podem faltar, afinal, Stela Basso Montoro pessoa incrível que divide sua vida comigo há 15 anos. O jeito enérgico, incisiva, garra, competência e força de vontade não mudam e me ensina todo dia. O seu apoio foi fundamental para que hoje eu chegasse aqui. É difícil colocar em poucas palavras tudo o que sinto. A minha admiração por você aumenta a cada dia como pessoa e profissional. Muito obrigado por fazer parte da minha vida, e me fazer melhorar a cada dia. Muito obrigado, te amo!

Se esqueci de alguém me perdoem. Agradeço imensamente a todos vocês por fazerem parte de mais uma importante etapa da minha vida pessoal e profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigado!

CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação de biocompatibilidade e biodegradação de Poli (ácido lático) associado a vitamina E em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)"**, protocolo nº 08665/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marco Antônio de Andrade Belo, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 04 de julho de 2019.

Vigência do Projeto	20/07/2019 a 20/04/2020
Espécie / Linhagem	*Oreochromis niloticus* / Tilápia do Nilo
Nº de animais	63
Peso / Idade	150 g
Sexo	Macho
Origem	CAUNESP

Jaboticabal, 04 de julho de 2019.

Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Desenvolvimento de estratégia profilática para controle de *Streptococcus agalactiae* e *aeromonas hydrophila* em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*), vacinados com bacterinas em veículo de Poli (ácido lático)"**, protocolo nº 08361/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marco Antônio de Andrade Belo, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 04 de julho de 2019.

Vigência do Projeto	15/07/2019 a 20/10/2021
Espécie / Linhagem	Oreochromis niloticus / Tilápia do Nilo
Nº de animais	123
Peso / Idade	50 g
Sexo	Macho
Origem	CAUNESP

Jaboticabal, 04 de julho de 2019.

Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIA PROFILÁTICA PARA CONTROLE DE *Streptococcus agalactiae* E *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis* niloticus), VACINADAS COM BACTERINAS EM VEÍCULO DE POLI (ÁCIDO LÁTICO)

RESUMO- A criação de Tilápias no território nacional tem se destacado dentre as demais espécies cultivadas. A tilapicultura gerou 2,30 bilhões de reais, dentre o montante de 5,96 bilhões faturado pelo setor aquícola. Dentro desta atividade, a biomanipulação do ecossistema aquático é fundamental para maximização de recursos e incremento da produção. Entretanto, o controle sanitário dos peixes é considerado ponto crítico pelo elevado adensamento no processo de criação resultando no aumento de estresse, causando imunossupressão. A diminuição do sistema imunológico causado pelo estresse aumenta a possibilidade da ocorrência de bacterioses responsáveis por elevada mortalidade e consequentemente grande prejuízo econômico ao setor aquícola. A estratégia para evitar surtos causados por bactérias como *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* é a vacinação. Nesse contexto, a utilização de adjuvantes (compostos químicos, orgânicos ou poliméricos) na composição vacinal é importante por incrementarem a resposta imunológica e tornar essa resposta mais longeva abrangendo todo o período de criação. Diante disso, o Poli(ácido lático) (PLA), vem sendo estudado como adjuvante (micropartículas e nanopartículas carreadoras) em formulação vacinais combinado inúmeros antígenos. O interesse nesse biomaterial está na capacidade de liberação lenta do antígeno vacinal por longos períodos e por causar reação inflamatória no *locus* de implantação. Após a implantação, a presença do biomaterial ativa a cascata de coagulação, recrutando polimorfonucleares (PMN) que se aderem ao biomaterial, liberando mediadores inflamatório como interleucina que são quimiotáticos para macrófagos, monócitos, células dendríticas. Embora o PLA desencadeie reação inflamatória, essa não é exacerbada indicando biocompatibilidade. A assimilação e fagocitose das macromoléculas poliméricas, as transformam em monômeros que são convertidos em água e dióxido de carbono no ciclo de Krebs denota o biomaterial como bioabsorvível. Ainda, pode ser incorporado ao PLA substâncias orgânicas como a vitamina E que auxilia a resposta imunológica dos peixes. À vista disso, a incorporação de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* em dispositivo de PLA como veículo vacinal de longa duração, determinar a segurança clínica (biocompatibilidade) após implantação intraperitoneal (IP) e subcutânea (SC), início e duração da resposta imunológica por implantação IP e por fim biodegradação do PLA é útil como estratégia no controle de bacterioses na criação de Tilápias.

Palavras-chave: Adjuvante; Bacterioses; Biossegurança; Biodegradação, Biomateriais

DEVELOPMENT OF A PROPHYLACTIC STRATEGY TO CONTROL *Streptococcus agalactiae* AND *Aeromonas hydrophila* IN NILE TILAPIA (Oreochromis niloticus), VACCINATED WITH BACTERIN IN POLY (LATIC ACID) VEHICLE

ABSTRACT– The creation of Tilapias in the national territory has stood out among the other cultivated species. Tilapia farming generated 2.30 billion reais out of the amount billed by the sector, which was 5.96 billion. Within this activity, the biomanipulation of the aquatic ecosystem is essential to maximize resources and increase production. However, the sanitary control of fish is considered a critical point due to the high density in the breeding process resulting in increased stress and causing immunosuppression. The decrease in the immune system caused by stress increases the possibility of the occurrence of bacteriosis responsible for high mortality and consequently great economic losses to the aquaculture sector. Strategy to avoid outbreaks caused by bacteria such as Aeromonas hydrophila and Streptococcus agalactiae are vaccination. In this context, the use of adjuvants in the vaccine composition is important because they increase the immune response and make this response longer, covering the entire period of creation. Therefore, Poly(lactic acid) (PLA) has been studied as an adjuvant (carrier microparticles and nanoparticles) in vaccine formulations combined with numerous antigens. The interest in this biomaterial lies in its ability to release the vaccine antigen slowly over long periods and causing an inflammatory reaction at the locus of implantation. After implantation presence of the biomaterial activates the coagulation cascade, recruiting polymorphonuclear cells (PMN) that adhere to the biomaterial, releasing inflammatory mediators such as interleukin that are chemotactic for macrophages, monocytes, and dendritic cells. Although PLA triggers an inflammatory reaction, it is not exacerbated, indicating biocompatibility, the assimilation and phagocytosis of the monomers that are converted into water and carbon dioxide in the Krebs cycle denotes the biomaterial as bioabsorbable. Also, organic substances such as vitamin E can be incorporated into PLA, which helps the immune response of fish. In view of this, the incorporation of Aeromonas hydrophila and Streptococcus agalactiae in a PLA device as a long-term vaccine vehicle, determine the clinical safety (biocompatibility) after intraperitoneal (IP) and subcutaneous (SC) implantation, onset and duration of the immune response by implantation IP and finally biodegradation of PLA is useful as a strategy in the control of bacterioses in the creation of Tilapias.

Keywords: Adjuvant; Bacterioses; Biosecurity; Biodegradation, Biomaterials

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A criação prevista de peixes de água doce para consumo humano no Brasil aumentou 25% nos últimos 5 anos, totalizando uma produção de ~530.000 a 760.000 toneladas em 2019 (Valenti et al., 2021). Os autores relatam que essa variação se dá por conta de que o Brasil tem vários órgãos que contabilizam essa produção como, Peixe BR e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). A principal espécie cultivada é a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) representando 61% da criação, seguida por tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e carpas, que representam 27%, 4% e 1% da criação respectivamente (Valenti et al., 2021).

Nesse contexto, para o incremento na produção de peixes é necessário que haja a biomanipulação dos ecossistemas aquáticos maximizando recursos produtivos. Entretanto, o manejo desses animais em criação trazem inúmeros desafios dentre os quais se destaca o controle sanitário das populações de peixes (Delphino et al., 2019a). Em geral, elevados adensamentos populacionais, somado às práticas de manejo, resultam na ocorrência do estresse, condição fisiológica responsável por imunossuprimir os sistemas de defesa dos peixes, predispondo-os as mais diversas enfermidades (BELO et al., 2012).

Diante disso, o manejo sanitário precário em sistemas intensivos de criação propicia o surgimento de doenças causadas por microrganismos aquáticos oportunistas como a *Aeromonas hydrophila* (Ah) e *Streptococcus agalactiae* (Sta) que, aparentemente causam poucos danos às populações de peixes em seu habitat natural, podendo tornar-se agentes precursores de doenças de grande importância econômica quando submetidos às condições de criação (BELO et al., 2013; Delphino et al., 2019b).

A necessidade de incremento e eficiência na produção de peixes é cada vez maior, tendo em vista a adversidade observada por meio de microrganismos

oportunistas, se torna fundamental estratégias para controle profilático como, o uso de vacinas (Aly et al., 2015).

A busca por adjuvantes capazes de liberar o antígeno vacinal por períodos prolongados e modular a resposta imunológica humoral e adquirida, se faz necessária na produção de proteína animal. Neste sentido, os biopolímeros produzidos a partir de matérias primas como, celulose, lignina, sacarose ou amido possuem potencial para sofrerem degradação, e apresentam diversas possibilidades de uso (Behera et al., 2010; Nampoothiri et al., 2010).

O ácido lático (monômero) é produzido a partir de recursos renováveis por meio da fermentação bacteriana do amido. A polimerização dos monômeros de ácido lático por abertura de anel produzirá o Poli(ácido lático) (PLA) (Garlotta, 2001). O PLA é extensamente estudado há mais de três décadas em inúmeras aplicações (Castro-Aguirre et al., 2016). A possibilidade de inovação na área biomédica utilizando esse biomaterial, conduziu pesquisas para desenvolvimento de fios de sutura (Cutright e Hunsuck, 1971), materiais de fixação óssea (Mcgovern et al., 2018), microesferas carreadoras de fármacos (Kastellorizios et al., 2015), engenharia de tecidos (Blackstone et al., 2018) e microesferas carreadoras de antígenos (Pavot et al., 2014).

Partículas poliméricas biodegradáveis carreadoras de antígenos peptídicos ou proteicos podem controlar a liberação de antígenos ao longo do tempo, o que potencialmente eliminaria doses de reforço (Leleux; Roy, 2013). A utilização de PLA como adjuvante demonstraram potencial no desenvolvimento de vacinas pois, pode compreender benefícios como: liberação sustentada de antígenos por longos períodos, potencial redução de doses reforço e direcionamento passivo ou ativo de células apresentadoras de antígenos (CAA), por meio de fagocitose não específica ou mediada por receptor (Pavot et al., 2014).

De Jong e colaboradores (2005) demostraram por meio de técnica imuno-histoquímica que duas semanas após a implantação, o PLA puro é capaz de atrair polimorfonucleares e expressar glicoproteínas CD4, CD8 e CD25 na superfície de linfócitos T. Assim, o encapsulamento de antígenos vacinais em PLA pode ser uma estratégia para aplicação em animais de produção pois, a absorção lenta do biomaterial somado a sinalização potencial ao sistema imune poderá aumentar a

resposta imunológica pela exposição prolongada ao antígeno e diminuir os custos de produção com aplicações de doses reforço.

Frente ao exposto, é de suma importância buscar novos materiais como adjuvantes vacinais para criação em larga escala de peixes. Diante disso, objetivou-se encapsular antígenos de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* em Poli(ácido lático) PLA como veículo vacinal de longa duração, determinar a segurança clínica do biomaterial (biocompatibilidade) após implantação intraperitoneal (IP) e subcutânea (SC), início e duração da resposta imunológica por implantação IP e por fim biorreabsorção do PLA.

5. Conclusão

Nossos resultados são promissores considerando a inclusão de bacterinas (sonicadas ou não) no processo de produção do dispositivo vacinal. A observação de resposta imunológica por elevação na titulação de imunoglobulinas M (IgM) e a manutenção destas IgM, principalmente no dispositivo elaborado com bacterinas sonicadas (PLASon) por período semelhante ao período de criação da tilápia que é de oito meses reforçam esses resultados. A ausência de reação adversas, mortalidade durante todo o período experimental e degradação parcial demonstram que a nossa formulação é biocompatível e biodegradável. Portanto, o PLA incrementa a resposta imune como adjuvante dos dispositivos vacinais polivalentes de liberação lenta sendo promissores na prevenção de doenças infecciosas em tilápias do Nilo.

6. Referências

[1] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática (2020). Pesquisa da Pecuária Municipal - IBGE SIDRA, Tabela 3940 - Produção da aquicultura, por tipo de produto. Brasília. Recuperado em 19 de setembro de 2020, https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940#resultado

[2] Tavares-Dias M, Martins ML An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. J. Parasit. Dis. 2017; *41*: 913-918.

[3] Delphino MK, Barone RS, Leal CA, Figueiredo HC, Gardner IA, Gonçalves, VS. 2019 Economic appraisal of vaccination against Streptoccocus agalactiae in Nile tilapia farms in Brazil. *Preventive veterinary medicine*. 2019; *162*: 131-135.

[4] Rodrigues MV, Dias MFF, Francisco CJ, David GS, da Silva RJ, Junior JPA. Aeromonas hydrophila in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) from Brazilian aquaculture: a public health problem. Emergent Life Sci. Res. 2019; *5*: 48-55.

[5] Fernandes DC, Eto SF, Funnicelli MI, Fernandes CC, Charlie-Silva I, Belo MA, Pizauro JM. Immunoglobulin Y in the diagnosis of Aeromonas hydrophila infection in Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Aquaculture. 2019; *500*: 576-585.

[6] Tafalla C, Bøgwald J, Dalmo RA. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. Fish Shellfish Immunol. 2013; *35:* 1740-1750.

[7] Taukhid, AM. Safety and efficacy test to immersion vaccine against Streptococcus agalactiae and Aeromonas hydrophila for Tilapia (Oreochromis niloticus). *In E3S Web of Conferences.* 2021; 322: 02004.

[8] Sukenda S, Sumiati T, Nuryati S, Lusiastuti AM, Hidayatullah D. Specific immune response kinetics and mortality patterns of tilapia Oreochromis niloticus on post-cocktail vaccination period against the infection of Aeromonas hydrophila and Streptococcus agalactiae. Omni-Akuatika. 2017; *13*.

[9] Wangkaghart E, Deville S, Wang B, Srisapoome P, Wang T, Secombes CJ. Immune response and protective efficacy of two new adjuvants, Montanide™ ISA 763B VG and Montanide™ GEL02, administered with a Streptococcus agalactiae ghost vaccine in Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Fish Shellfish Immunol. 2021; *116*: 19-29.

[10] Nayak SK. Current prospects and challenges in fish vaccine development in India with special reference to Aeromonas hydrophila vaccine. Fish Shellfish Immunol. 2020; *100*: 283-299.

[11] Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC. Immune responses to implants–a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. Biomaterials. 2011; *32*: 6692-6709.

[12] Conde G, Aracati MF, Rodrigues LF, de Oliveira SL, da Costa CC, Charlie-Silva I, Ruiz TFR, Taboga SR, de Andrade Belo MA. Device implant based on poly (lactic acid) with vitamin E for vaccine delivery system in Tilapia: Study for biocompatibility and biodegradation. Fish Shellfish Immunol Reports. 2022; *3*: 100060.

[13] McNally AK, Anderson, JM. Foreign body-type multinucleated giant cell formation is potently induced by α-tocopherol and prevented by the diacylglycerol kinase inhibitor R59022. Am. J. Pathol. 2003; *163*: 1147-1156.

[14] Reno F, Paul G, Rizzi M, Gatti G, Marchese L. Poly (D, L) lactic acid blending with vitamin E increases polymer hemocompatibility: An hydrophilic effect. J. Appl. Polym. Sci. 2013; *129*: 1527-1533.

[15] Boyd Claude E, 1990. Water Quality in Ponds for Aquaculture, Alabama Agricultural Experiment 416 Station, Auburn University, AL, USA.

[16] Mu L, Feng SS. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol®). J. Controlled Release. 2002; *80*: 129-144.

[17] PRADO, Ed Johnny da Rosa. Insulina e dexametasona na aerocistite aguda induzida por Aeromonas hydrophila em tilápias do Nilo, Oreochromis niloticus, Aloxano-diabéticas. 2014.

[18] Sen SS, Giri SS, Sukumaran V. Immune responses and protection in rohu vaccinated against Aeromonas hydrophila infection. Aquacult. Int. 2014; *22*: 1637-1648.

[19] Ciambelli GS, Perez MO, Siqueira GV, Candella MA, Motta AC, Duarte M AT, Duek EADR. Characterization of poly (L-co-D, L Lactic Acid) and a study of polymer-tissue interaction in subcutaneous implants in wistar rats. Mater. Res. 2013; *16*: 28-37.

[20] Miszuk JM, Xu T, Yao Q, Fang F, Childs JD, Hong Z, Sun H. Functionalization of PCL-3D electrospun nanofibrous scaffolds for improved BMP2-induced bone formation. Applied materials today. 2018; *10*: 194-202.

[21] Farias THV, Levy-Pereira N, de Oliveira Alves L, de Carla Dias D, Tachibana L, Pilarski F, Ranzani-Paiva MJT. Probiotic feeding improves the immunity of pacus, Piaractus mesopotamicus, during Aeromonas hydrophila infection. Anim. Feed Sci. Technol. 2016; *211*: 137-144.

[22] De Jong WH, Bergsma JE, Robinson JE, Bos RR. Tissue response to partially in vitro predegraded poly-L-lactide implants. Biomaterials. 2005; *26*: 1781-1791.

[23] Conde G, De Carvalho JRG, do Patrocínio Dias P, Moranza HG, Montanhim GL, de Oliveira Ribeiro J, de Camargo Ferraz G. In vivo biocompatibility and biodegradability of poly (lactic acid)/poly (ε-caprolactone) blend compatibilized with poly (ε-caprolactone-b-tetrahydrofuran) in Wistar rats. Biomedical Physics & Engineering Express. 2021; *7:* 035005.

[24] Raghuvanshi RS, Katare YK, Lalwani K, Ali MM, Singh O, Panda AK. Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by

use of different immunization protocol and adjuvants. Int. J. Pharm. 2002; *245*: 109-121.

[25] Johansen P, Moon L, Tamber H, Merkle HP, Gander B, Sesardic D. Immunogenicity of single-dose diphtheria vaccines based on PLA/PLGA microspheres in guinea pigs. Vaccine. 1999; *18*: 209-215.

[26] Saini V, Jain V, Sudheesh MS, Dixit S, Gaur RL, Sahoo MK, Kohli D. Humoral and cell-mediated immune-responses after administration of a single-shot recombinant hepatitis B surface antigen vaccine formulated with cationic poly (l-lactide) microspheres. J. Drug Targeting. 2010; *18*: 212-222.

[27] Ataman-Önal Y, Munier S, Ganée A, Terrat C, Durand PY, Battail N, Verrier B. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. J. Controlled Release. 2006; *112*: 175-185.

[28] Guillon C, Mayol K, Terrat C, Compagnon C, Primard C, Charles MH, Verrier B. Formulation of HIV-1 Tat and p24 antigens by PLA nanoparticles or MF59 impacts the breadth, but not the magnitude, of serum and faecal antibody responses in rabbits. Vaccine. 2007; *25*: 7491-7501.

[29] Pavot V, Rochereau N, Primard C, Genin C, Perouzel E, Lioux T, Verrier B. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly (lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. J. Controlled Release. 2013; *167*: 60-67.

[30] Garlotta D. A literature review of poly (lactic acid). J. Polym. Environ. 2001; *9*: 63-84.

[31] Belo MAA, Souza DGF, Faria VP, Prado EJR, Moraes FR, Onaka, EM. Haematological response of curimbas Prochilodus lineatus, naturally infected with Neoechinorhynchus curemai. J. Fish Biol. 2013; *82*: 1403-1410.

[32] Delphino MK, Leal CA, Gardner IA, Assis GB, Roriz GD, Ferreira F, Gonçalves VS. Seasonal dynamics of bacterial pathogens of Nile tilapia farmed in a Brazilian reservoir. Aquaculture. 2019; *498*: 100-108.

[33] Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. In Seminars in immunology. 2008; 20: 86-100. Academic Press.

[34] Capuani S, Malgir G, Chua, CYX, Grattoni A. Advanced strategies to thwart foreign body response to implantable devices. Bioeng. Transl. Med. 2022; 10300.

[35] Anderson JM. Biological responses to materials. Annual review of materials research. 2001; *31*: 81-110.

[36] Veiseh O, Vegas AJ. Domesticating the foreign body response: recent advances and applications. Adv. Drug Delivery Rev. 2019; *144*: 148-161.

[37] Mokhtar DM, Abdelhafez EA. An overview of the structural and functional aspects of immune cells in teleosts. Histol. Histopathol. 2021; 18302-18302.

[38] Mokhtar DM, Hussein MM. Microanalysis of fish ovarian follicular atresia: A possible synergic action of somatic and immune cells. Microsc. Microanal. 2020; *26*: 599-608.

[39] Jordanova M, Miteva N, Rocha E. A quantitative study of the hepatic eosinophilic granule cells and rodlet cells during the breeding cycle of Ohrid trout, Salmo letnica Kar.(Teloestei, Salmonidae). Fish Shellfish Immunol. 2007; *23*: 473-478.

[40] Matsuyama T, Iida T. Degranulation of eosinophilic granular cells with possible involvement in neutrophil migration to site of inflammation in tilapia. Dev. Comp. Immunol. 1999; *23*: 451-457.

[41] Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat. Rev. Immunol. 2008; *8*: 958-969.

[42] Xia ZD, Zhu TB, Du JY, Zheng QX, Wang L, Li SP, Fang SY. Macrophages in degradation of collagen/hydroxylapatite (CHA), beta-tricalcium phosphate ceramics (TCP) artificial bone graft: An in vivo study. Chin. Med. J. 1994; *107*: 845-849.

[43] Kalbacova M, Roessler S, Hempel U, Tsaryk R, Peters K, Scharnweber D, Dieter P. The effect of electrochemically simulated titanium cathodic corrosion products on ROS production and metabolic activity of osteoblasts and monocytes/macrophages. Biomaterials. 2007; *28*: 3263-3272.

[44] Vogelbein WK, Fournie JW, Overstreet RM. Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melano-macrophage centres in Rivulus marmoratus. J. Fish Biol. 1987; *31*: 145-153.

[45] Zapata AG. Lympho-Hematopoietic Microenvironments and Fish Immune System. Biology. 2022; *11*: 747.

[46] Herraez MP, Zapata AG. Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfishCarassius auratus. Vet. Immunol. Immunopathol. 1986; *12*: 117-126.

[47] Magor BG. Antibody affinity maturation in fishes—our current understanding. Biology. 2015; *4*: 512-524.

[48] Saunders HL, Oko AL, Scott AN, Fan CW, Magor BG. The cellular context of AID expressing cells in fish lymphoid tissues. Dev. Comp. Immunol. 2010; *34*: 669-676.

[49] Fast MD, Sims DE, Burka JF, Mustafa A, Ross NW. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol. 2002; *132*: 645-657.

[50] Wu L, Fu S, Yin X, Guo Z, Wang A, Ye J. Long-lived plasma cells secrete high-affinity antibodies responding to a T-dependent immunization in a teleost fish. Front. Immunol. 2019; *10*: 2324.

[51] Muthupandian A, Waly D, Magor BG. Do ectothermic vertebrates have a home in which to affinity mature their antibody responses?. Dev. Comp. Immunol. 2021; *119*: 104021.

[52] Brudeseth BE, Wiulsrød R, Fredriksen BN, Lindmo K, Løkling KE, Bordevik, M, Gravningen K. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. Fish Shellfish Immunol. 2013; *35*: 1759-1768.

[53] Wang C, Hu YH, Chi H, Sun L. The major fimbrial subunit protein of Edwardsiella tarda: vaccine potential, adjuvant effect, and involvement in host infection. Fish Shellfish Immunol. 2013; *35*: 858-865.

[54] Behera T, Nanda PK, Mohanty C, Mohapatra D, Swain P, Das BK, Sahoo S. K. Parenteral immunization of fish, Labeo rohita with Poly D, L-lactide-co-glycolic acid (PLGA) encapsulated antigen microparticles promotes innate and adaptive immune responses. Fish Shellfish Immunol. 2010; *28*: 320-325.

[55] Yin X, Mu L, Fu S, Wu L, Han K, Wu H, Ye J. Expression and characterization of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) secretory and membrane-bound IgM in response to bacterial infection. Aquaculture. 2019; *508*: 214-222.

[56] Farias THV, Arijo S, Medina A, Pala G, da Rosa Prado EJ, Montassier HJ, de Andrade Belo MA. Immune responses induced by inactivated vaccine against Aeromonas hydrophila in pacu, Piaractus mesopotamicus. Fish Shellfish Immunol. 2020; *101*: 186-191.

[57] Aly SM, Albutti AS, Rahmani AH, Atti NMA. The response of New-season Nile tilapia to Aeromonas hydrophila vaccine. Int. J. Clin. Exp. Med. 2015; *8*: 4508.

[58] Pavot V, Berthet M, Resseguier J, Legaz S, Handké N, Gilbert SC, Verrier B. Poly (lactic acid) and poly (lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. Nanomedicine. 2014; *9*: 2703-2718.

[59] Giri SS, Kim SG, Kang JW, Kim SW, Kwon J, Lee SB, Park SC. Applications of carbon nanotubes and polymeric micro-/nanoparticles in fish vaccine delivery: progress and future perspectives. Reviews in Aquaculture. 2021; *13*: 1844-1863.

[60] Onuma Y, Serruys PW. Bioresorbable scaffold: the advent of a new era in percutaneous coronary and peripheral revascularization?. Circulation. 2011; *123*: 779-797.

[61] Wang B, Chen J, Peng H, Gai J, Kang J, Cao Y. Investigation on changes in the miscibility, morphology, rheology and mechanical behavior of melt processed cellulose acetate through adding polyethylene glycol as a plasticizer. J. Macromol. Sci., Part B: Phys. 2016; *55*: 894-907.

[62] Ahmed MK, Menazea AA, Abdelghany AM. Blend biopolymeric nanofibrous scaffolds of cellulose acetate/ε-polycaprolactone containing metallic nanoparticles prepared by laser ablation for wound disinfection applications. Int. J. Biol. Macromol. 2020; *155*: 636-644.

[63] Herrera-Kao WA, Loría-Bastarrachea MI, Pérez-Padilla Y, Cauich-Rodríguez JV, Vázquez-Torres H, Cervantes-Uc JM. Thermal degradation of poly (caprolactone), poly (lactic acid), and poly (hydroxybutyrate) studied by TGA/FTIR and other analytical techniques. Polym. Bull. 2018; *75*: 4191-4205.

[64] Moosavinejad SM, Madhoushi M, Vakili M, Rasouli D. Evaluation of degradation in chemical compounds of wood in historical buildings using FT-IR and FT-Raman vibrational spectroscopy. Maderas. Ciencia y tecnologia. 2019; *21*: 381-392.

[65] Leroy A, Ribeiro S, Grossiord C, Alves A, Vestberg RH, Salles V, Bayon Y. FTIR microscopy contribution for comprehension of degradation mechanisms in PLA-based implantable medical devices. J. Mater. Sci.: Mater. Med. 2017; *28*: 1-13.

[66] Aworinde AK, Adeosun SO, Oyawale FA, Akinlabi ET, Akinlabi SA. Comparative effects of organic and inorganic bio-fillers on the hydrophobicity of polylactic acid. Results Eng. 2020; *5*: 100098.

[67] Carvalho JR, Conde G, Antonioli ML, Dias PP, Vasconcelos RO, Taboga SR, Ferraz GC. Biocompatibility and biodegradation of poly (lactic acid)(PLA) and an immiscible PLA/poly (ε-caprolactone)(PCL) blend compatibilized by poly (ε-caprolactone-b-tetrahydrofuran) implanted in horses. Polym. J. 2020; *52*: 629-643.

[68] Carvalho JRG, Conde G, Antonioli ML, Santana CH, Littiere TO, Dias PP, Ferraz GC. Long-term evaluation of poly (lactic acid)(PLA) implants in a horse: an experimental pilot study. Molecules. 2021; *26*: 7224.

[69] Pogorielov M, Hapchenko A, Deineka V, Rogulska L, Oleshko O, Vodseďálková K, Erben J. In vitro degradation and in vivo toxicity of NanoMatrix3D® polycaprolactone and poly (lactic acid) nanofibrous scaffolds. J. Biomed. Mater. Res., Part A. 2018; *106*: 2200-2212.

[70] Schubert MA, Wiggins MJ, DeFife KM, Hiltner A, Anderson JM. Vitamin E as an antioxidant for poly (etherurethane urea): in vivo studies. J. Biomed. Mater. Res. 1996; *32*: 493-504.

[71] Fournier E, Passirani C, Montero-Menei CN, Benoit JP. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. Biomaterials. 2003; *24*: 3311-3331.

[72] Ramot Y, Haim-Zada M, Domb AJ, Nyska A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. Adv. Drug Delivery Rev. 2016; *107*: 153-162.

[73] Munang'andu HM, Evensen Ø. Correlates of protective immunity for fish vaccines. Fish Shellfish Immunol. 2019; *85*: 132-140.