

**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

**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 <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Aeromonas hydrophila</i> em Tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>), vacinadas com bacterinas em veículo de Poli (ácido láctico) / 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 imunológicos. 2. Bacterioses. 3. Contenção de riscos biológicos. 4. Biodegradação. 5. Materiais biomédicos. 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 (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodutiva e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. ANNELESE CARLA CAMPESI DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP -Jaboticabal

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

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

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

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 nº 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-histoquímica 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!

SUMÁRIO

CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iv
DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIA PROFILÁTICA PARA CONTROLE DE <i>Streptococcus agalactiae</i> E <i>Aeromonas hydrophila</i> EM TILÁPIAS DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>), VACINADAS COM BACTERINAS EM VEÍCULO DE POLI (ÁCIDO LÁTICO)	vi
RESUMO-.....	vi
DEVELOPMENT OF A PROPHYLACTIC STRATEGY TO CONTROL <i>Streptococcus agalactiae</i> AND <i>Aeromonas hydrophila</i> IN NILE TILAPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>), VACCINATED WITH BACTERIN IN POLY (LACTIC ACID) VEHICLE	vii
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Aeromonas hydrophila</i> (Ah).....	3
2.2 <i>Streptococcus agalactiae</i> (Sta).....	4
2.3 Poli(Ácido Lático) (PLA) – biodegradação, bioreabsorção e biocompatibilidade	5
3. IMPLICAÇÕES	9
4. REFERÊNCIAS	12
Capítulo 2 - Device implant based on poly(lactic acid) with vitamin E for vaccine delivery system in Tilapia: Study for biocompatibility and biodegradation.....	20
Abstract.....	20
1. Introduction.....	21
2. Materials and Methods	23
2.1 <i>Animals and experimental design</i>	23
2.2 <i>Device of poly (lactic acid) and implantation</i>	23
2.3 <i>Blood analysis</i>	24
2.4 <i>Reactive Oxygen Species (NBT assay)</i>	24

2.5 Serum biochemistry	25
2.6 Histopathology	25
2.6.1 Eosinophilic granular cells (EGCs) and phagocytosis points count ...	25
2.6.2 Histochemistry and Immunohistochemistry	26
2.7 Analysis of melanomacrophage centers (MMCs)	26
2.8 Statistical analysis	27
3. Results	27
3.1 Polymeric implants	27
3.2 Spleen melanomacrophage centers (MMCs)	35
3.3 Hematological analysis	37
3.4 Serum biochemical analyzes	40
4. Discussion	42
5. References	46
Capítulo 3 - Resposta imune adaptativa (IgM) de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) vacinadas com dispositivo polivalente de Poli(ácido láctico) como adjuvante contra <i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Streptococcus Agalactiae</i> ¹	55
1. Introdução	56
2. Materiais e Métodos	58
2.1 Animais e desenho experimental	58
2.2 Dispositivo vacinais de poli(ácido láctico) e vacina	58
2.3 Preparação do inóculo bacteriano	59
2.4 Implantação e vacinação	60
2.5 Coleta de sangue	60
2.6 Atividade respiratória de leucócitos (ensaio de NBT)	61
2.7 Elisa indireto para determinação da concentração sérica de anticorpos (IgM)	61
2.8 Estudo Histopatológico	62
2.9 Caracterização dos dispositivos	63
2.9.1 Estudo de degradação <i>in vivo</i>	63
2.9.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	63
2.9.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	63
2.10 Análise estatística	64
3. Resultados	64
3.1 Concentração sérica de imunoglobulina M (IgM)	64

3.2 Atividade respiratória de leucócitos	65
3.3 Caracterização dos dispositivos	68
3.3.1 Histopatologia	68
3.3.2 Estudo de degradação <i>in vivo</i>	72
3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	72
3.3.4 Espectroscopia de Infravermelha com Transformada de Fourier (FTIR)	74
4. Discussão	75
5. Conclusão	81
6. Referências	81

CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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



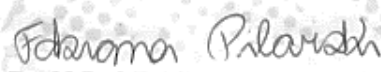
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

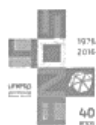
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação de biocompatibilidade e biodegradação de Poli (ácido láctico) associado a vitamina E em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**", protocolo nº 08665/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marco Antônio de Andrade Belo, que envolve a 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	<i>Oreochromis niloticus</i> / 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



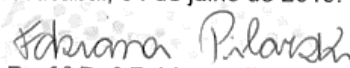
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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 láctico)**", 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 conseqüentemente 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 longa 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 (LACTIC 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

LISTA DE ABREVIATURAS

Ah - *Aeromonas hydrophila*

ALP - Alkaline phosphatase

ALT - Alanine aminotransferase

AST - Aspartate aminotransferase

BSA – Albumina sérica bovina

CAA - Células apresentadoras de antígenos

CGEC - Células gigantes de corpo estranho

CGs - Centros germinativos

cm⁻¹ - Centímetro

°C – graus Celsius

DCM - Dichloromethane

DPI – Days post-implantation

DSC - Calorimetria diferencial exploratória

EGCs - Eosinophilic granular cells

EROs - Espécies de oxigênio reativo

F4/80+ - Phagocytic cells

FBGC - Foreign body giant cells

FDA – Food and Drug Administration

FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

H&E – Hematoxilina-eosina

H&E – Hematoxylin-eosina

Hb - Hemoglobin concentration

HE – Hematoxilina e Eosina

Ht - Hematocrit

IgM – Imunoglobulina M

IHC - Histochemistry and immunohistochemistry

IL-4 - interleukin-4

IP – Intraperitoneal

L min⁻¹ – Litros por minuto

MCHC - mean corpuscular hemoglobin concentration

MCV - Mean corpuscular volume

MEV – Microscopia eletrônica de Varredura

mg.kg⁻¹ – Miligramas por quilo grama

mL⁻¹ – Mililitros

mm – Milímetros

mM – Milimolar

mm² – Milímetros quadrados

MMCs – Melanomacrophage centers

NaCl – Cloreto de sódio

NaClO – Hipoclorito de sódio

nm – Nanometros

o / w - Oil-in-water

PAMPs - Pathogen-associated molecular patterns

PAS - Periodic Acid Schiff

PBS – Tampão fosfato salino

PLA - Poli (ácido láctico)

PMAPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PMN – Polimorfonucleares

PRR - Pattern recognition receptors

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNM - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

RRPs - Receptores de reconhecimento padrão

SC – Subcutâneo

SNC – Sistema nervoso central

Sta - *Streptococcus agalactiae*

TLRs - Receptores *Toll Like*

v:v – Porcentagem volume-volume

VitE - Vitamina E

w / o / w - Water-oil-water

µm² – micrometro quadrado

µg.mL⁻¹ – Microgramas por mililitros

μL - Microlitros

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2.

Table 1. Means¹ values observed in the histopathological study of spleen melanomacrophage centers of tilapia post implantation.....34

Table 2. Correlation analysis between respiratory burst activity values and the absolute number of leukocytes and thrombocytes counts in the blood of tilapias post-implantation.....37

Table 3. Means¹ values observed in the blood analysis of tilapia post-implantation.....38

Capítulo 3.

Tabela 1. Análise de correlação entre os valores de atividade respiratória de leucócitos e os valores de absorbância de imunoglobulinas de tilápias pós-implantação e pós-vacinação.....65

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2.

Figure 1. Photomicrographs of PLAVE and PLA subcutaneous implants in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), stained with H&E. **(A - B)** diffuse mononuclear inflammatory infiltrate in the skin tissue adjacent to the fibrotic capsule (fc), neovascularization in the capsule and skin tissue (thin arrows), and in **(B)** presence of the eosinophilic granular cell; (DV) polymer location region (scale bar = 20µm). **(C - D)** fibrotic capsule (fc) with phagocyte cells paving and tissue projections on the polymer (thick black arrow), and in **(D)** presence of the eosinophilic granular cell in capsule; (CI) cell infiltration within the polymer, (DV) region of polymer location (scale bar = 20µm). **(E - F)** fibrotic capsule (fc) with phagocyte cells paving and surrounding the polymer (thick black arrow), and (*) phagocytosis points, (CI) cell infiltration within the polymer, phagocytosis points (*), (DV) polymer localization region (scale bar = 50µm). **(E inset)** cell bridge connected to fibrotic capsule (fc) between the ends of the polymer (scale bar = 100µm) **(G - H)** fibrotic capsule (fc) with macrophage paving and tissue projections on the polymer (thick black arrow), multinucleated giant cells and phagocytosis points (*), (CI) cell growth within polymer, (DV) polymer location region (D; scale bar = 20µm; E; scale bar = 50µm).....26

Figure 2. Photomicrographs of PLAVE and PLA intraperitoneal implants in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), stained with H&E. **(A - B)** diffuse mononuclear inflammatory infiltrate in the omentum adjacent to fibrotic capsule (fc), neovascularization in the capsule and omentum (thin arrows), and (DV) polymer location region (A; scale bar = 50µm; E; scale bar = 100µm) (A inset) neovascularization (thin arrows) in omentum (bar = 20 µm). **(C - D)** fibrotic capsule (fc) with macrophage paving and tissue projections on the polymer (thick black arrow), and in **(D)** presence of the eosinophilic granular cell in capsule. (CI) cell infiltration into the polymer and (DV) region of polymer location (scale bar = 20µm). **(E - F)** fibrotic capsule (fc) with macrophage paving and tissue projections with phagocyte cells into the polymer and surrounding the polymer (thick black arrow), and in **(E)** presence of the eosinophilic granular cell in capsule, (CI) cell infiltration within the polymer, and (DV) polymer location region (scale bar = 20µm). **(G - H)** fibrotic capsule (fc) with macrophage paving and tissue projections on the polymer, phagocyte cells surrounding the polymer (thick black arrow), and (*) phagocytosis points, (CI) cell infiltration into the polymer and (DV) region of polymer location (scale bar = 20µm).....28

Figure 3: Photomicrographs of PLAVE and PLA intraperitoneal and subcutaneous implants in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **(A-D)** Mast cells (MCs) stained with Toluidine Blue (1% pH 4.0) in intraperitoneal implantation, **(A)** in fibrous capsule (fc) adjacent to polymer (black arrow; bar = 10µm), and in **(B)** cell growth (ci) within polymer (*) with mast cells (black arrow; scale bar = 10µm). **(C)** Mast cells observed in intraperitoneal fibrous capsule (fc) near polymer (*), and **(D)** mast cells observed in intraperitoneal fibrous capsule (fc) (black arrow; scale bar = 10µm). **(E-H)** Eosinophilic granular cells (EGCs) stained with Periodic Acid Schiff (PAS) in subcutaneous implant. **(E)** EGCs observed inflammatory focus (if) close to fibrous capsule (fc) (bar = 20µm); **(E inset)** eosinophilic granular cell (EGCs) (scale bar = 10µm). **(F)** EGCs (black arrow) observed in fibrous capsule (fc) close to polymer (*) (scale bar = 20µm). **(G)** inflammatory infiltrated (ii) with EGCs near to a blood vessel in fibrous capsule (fc), and **(H)** inflammatory infiltrated (ii) in fibrous capsule close to polymer (*) (scale bar = 20µm). **(I-L)** Phagocytes (F4/80 +) immunohistochemistry. **(I)** Phagocytes (black arrow) in fibrous capsule (fc) near polymer (*) in subcutaneous site (scale bar = 10µm), and **(J)** phagocytes (black arrow) in fibrous capsule (fc) and within cell growth within polymer (*) (scale bar = 10µm). **(K)** Fibrous capsule (fc) with phagocyte (black arrow) in intraperitoneal implantation (scale bar = 10µm), and **(L)** phagocytes (black arrow) observed in omentum adipose tissue (scale bar = 10µm). **(M-P)** Melanomacrophages phagocytes (MMs). **(M)** Fibrous capsule (fc) presenting melanomacrophages (black arrow) close to polymer (*) in subcutaneous site (scale bar = 10µm). **(N)** Melanomacrophage phagocytes near to fibrous capsule (fc). Note the melanomacrophage inside fibrous capsule (arrowhead; scale bar = 20µm), and **(N inset)** negative control stained without primary antibody (F4/80), it is possible note that fibrous capsule is not stained (bar = 20µm). **(O)** Melanomacrophage in the fibrous capsule (fc) intraperitoneal implantation, and **(P)** melanomacrophage phagocytes near and inside fibrous capsule (fc) at the polymer (*) (O, and P; scale bar = 10µm).....30

Figure 4. Heat map of tissue response scores of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The intensity of the color grade (color gradient) represents the magnitude of the score, and the more dark blue indicates a more massive tissue reaction (**A**, **B**, **C**, and **D**). The clustering tree at the days post-implantation (DPI) level was constructed at the bottom and tissue reactions were constructed at the left side, showing the relationship between time points (DPI) and histopathological analysis. The characteristic inflammatory tissue reaction to the implant was classified semi-quantitatively by scores (De Jong et al., 2005). 1- mild reaction; 2- moderate reaction; 3- intense reaction; 4- severe reaction. Hematoxylin-Eosin Staining. Means values ($\pm$ SE) and Kruskal-Wallis¹ test observed in the

eosinophilic granular cells (**E**) and phagocytosis points counts (**F**) of tilapia post-implantation. Means ($n = 7$ fish/ treatment/ day sampling) followed by the same letter do not differ by the Dunn's test ($P < 0.05$). Lowercase letters compare treatments in each experimental period, while symbols (* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P \leq 0.001$). Sampling Period: 15, 30, 60, and 120 days post-implant (DPI); Two sites implantation: intraperitoneal (IP) and subcutaneous (SC); Treatments: PLA (polylactic acid), PLAVE (polylactic acid + vitamin E).....31

Figure 5. Photomicrographs of PLAVE and PLA intraperitoneal or subcutaneous implants in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **(A)** Phagocytosis sites (black arrow) stained with primary antibody (F4/80+) between fibrous capsule (fc) and polymer (DV) in subcutaneous at 60 DPI (bar = 50 μ m). **(B)** Phagocyte cell (black arrow) stained with primary antibody (F4/80+) around piece of polymer (*) in process to phagocytosis in the fibrous capsule (fc) in subcutaneous at 60 DPI (bar = 10 μ m). **(C)** Piece of polymer inside phagocyte cell (black arrow) stained toluidine blue (1%, pH 4.0) in intraperitoneal at 120 DPI (bar = 10 μ m). **(D)** Phagocyte cells inside of melanomacrophage center in spleen (black arrows) stained with primary antibody (F4/80+) at 120 DPI (bar = 10 μ m).....33

Figure 6. Photomicrographs stained by toluidine blue, Perl's, and Schmorl's of spleen melanomacrophages centers in Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*) at 15 and 120 DPI. Control (without implant), PLA (polylactic acid) and PLAVE (polylactic acid + vitamin E) (bar = 20 μ m).....35

Figure 7: Means values ($\pm$ SE) and Kruskal-Wallis¹ observed in the white blood cell counts of tilapia post-implantation. Means ($n = 7$ fish/ treatment/ day sampling) followed by the same letter do not differ by the Dunn's test ($P < 0.05$). Lowercase letters compare treatments in each experimental period, while symbols (* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P \leq 0.001$). Sampling Period: 15, 30, 60, and 120 days post-implant (DPI); Treatments: PLA (polylactic acid), PLAVE (polylactic acid + vitamin E) and control (without implant).....36

Figure 8: Means values ($\pm$ SE) and Kruskal-Wallis¹ observed in serum biochemical analyzes of ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), ALP (alkaline phosphatase), total protein, and blood glucose of tilapia post-implantation. Means ($n = 7$ fish/ treatment/ day sampling) followed by the same letter do not differ by the Dunn's test ($P < 0.05$). Lowercase letters compare treatments in each experimental period,

while symbols (* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P \leq 0.001$) evaluate the evolution of each treatment among experimental periods. Sampling Period: 15, 30, 60, and 120 days post-implant (DPI); Treatments: PLA (polylactic acid), PLAVE (polylactic acid + vitamin E) and control (without implant).....39

Capítulo 3.

Figura 1. Valores médios ($\pm$ Erro Padrão) da concentração sérica de imunoglobulinas M (IgM) contra *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* observados em soro de tilápias pós-implantação e vacinação. Médias avaliadas por Kruskal-Wallis seguidos da mesma letra não diferem no teste de Dunn's ($p < 0,05$). Letras Maiúsculas comparam cada tratamento ao longo do tempo experimental. Período de amostragem: 0 (padrão, $n = 12$ peixes por tanque; total = 48 peixes), 28 ($n = 12$ peixes por tanque), 70, 126, 182 ($n = 24$ peixes por tanque por período amostrado) DPIV. Tratamentos: PLACon (Poli ácido láctico) + VitE + bacterinas; PLASon (Poli ácido láctico) + VitE + bacterinas sonicadas; VacCon (15% de adjuvante + bacterinas); VacSon (15% adjuvante + bacterinas sonicadas).....63

Figura 2. Valores médios ($\pm$ Erro Padrão) da atividade respiratória de leucócitos observados em soro de tilápias pós-implantação e vacinação. Médias avaliadas por Kruskal-Wallis seguidos da mesma letra não diferem no teste de Dunn's ($p < 0,05$). Letras Maiúsculas comparam cada tratamento ao longo do tempo experimental. Letras minúsculas comparam os tratamentos em cada período. Período de amostragem: 0 (padrão, linha pontilhada; $n = 12$ peixes por tanque; total = 48 peixes), 28 ($n = 12$ peixes por tanque), 70, 126, 182 ($n = 24$ peixes por tanque por período amostrado) DPIV. Tratamentos: PLACon (Poli ácido láctico) + VitE + bacterinas; PLASon (Poli ácido láctico) + VitE + bacterinas sonicadas; VacCon (15% de adjuvante + bacterinas); VacSon (15% adjuvante + bacterinas sonicadas).....64

Figura 3. Fotomicrografias de PLASon, PLACon, VacSon e VacCon implantados e inoculados por via intraperitoneal em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) corados com hematoxilina-eosina (H&E). **(A)** PLASon apresentando infiltrado mononuclear inflamatório difuso no omento adjacente a cápsula fibrótica (ca) em uma parte polimérica desprendida do dispositivo (dp) implantado, células granulocíticas eosinofílicas ao redor da cápsula (setas pretas), crescimento celular dentro do dispositivo (cabeça de seta) e pontos

de fagocitose (*) com células gigantes de corpo estranho (CGCE) no tecido adiposo do omento (ta) (barra = 200 μ m). **(E)** PLACon com intenso crescimento celular dentro do dispositivo (dp) formando ponte entre as cápsulas fibróticas iniciais (ca), pontos de fagocitose com CGCE (*) no tecido adiposo do omento (ta) e dentro do dispositivo implantado e melanomacrófagos entorno (setas pretas) (barra = 200 μ m). **(B)** PLASon e **(F)** PLACon apresentando pontos de fagocitose (*) com melanomacrófagos no interior das CGCE (setas finas), células granulocíticas eosinofílicas degranuladas (cabeça de seta) e células granulocíticas eosinofílicas entorno das CGCE (B e F; barra = 20 μ m). **(I - J)** VacSon e **(N - O)** VacCon tecido adiposo (ta) do omento com células granulocíticas eosinofílicas e macrófagos (setas pretas) (I e N; barra = 50 μ m; J e O; barra = 10 μ m). **(C insete)** PLASon apresentando grande quantidade de pontos de fagocitose CGCE no omento próximo a cápsula (ca) e ao dispositivo implantado (dp) (barra = 200 μ m). **(C)** Cápsula fibrótica (ca) com três pontos de fagocitose (*) grande quantidade de melanomacrófagos entorno das CGCE e no interior destas células (setas pretas), projeções teciduais e crescimento celular (cabeça de seta) no dispositivo (dp) (barra = 50 μ m). **(G)** PLACon apresentando moderado infiltrado inflamatório mononuclear e ponto de fagocitose (*) na cápsula fibrótica (ca), projeção tecidual (cabeça de seta) e crescimento celular no dispositivo (dp) (barra = 50 μ m). **(D)** PLASon células gigantes de corpo estranho fagocitando partes do dispositivo (*) no tecido adiposo do omento (ta) com melanomacrófagos no interior (setas pretas) (barra = 20 μ m). **(H)** PLACon intenso crescimento celular (cc) e células inflamatórias (setas pretas) no interior do dispositivo (dp) (barra = 20 μ m). **(L - M)** VacSon e **(P - Q)** VacCon tecido adiposo do omento (ta) com poucas células granulocíticas eosinofílicas (setas pretas) (L e P; barra = 50 μ m; M e Q; barra = 10 μ m).....67

Figura 4. Mapa de calor (*Heatmap*) dos escores de resposta tecidual 126 e 182 dias pós-implantação (DPI) por via intraperitoneal em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A intensidade do grau de cor (gradiente de cor) representa a severidade do escore, em que o azul mais escuro (intenso) significou uma reação tecidual mais acentuada **(A, B, C e D)**. O agrupamento no nível de dias pós-implantação (DPI) foi construída na parte inferior e as reações teciduais dos grupos avaliados foram construídas no lado esquerdo, mostrando a relação entre os pontos de tempo (DPI) e a análise histopatológica. A reação tecidual inflamatória característica ao implante foi classificada semiquantitativamente por escores [12; 21; 22]. 1- reação leve; 2- reação moderada; 3- reação intensa; 4- reação grave. Coloração hematoxilina-eosina (H&E).....69

- Figura 5.** Valores médios ($\pm$ Erro Padrão) do estudo de degradação *in vivo* obtidos antes da implantação (n=10) e 182 dias pós-implantação (DPI) (n = 3 dispositivos coletados aleatoriamente). Tratamentos: PLACon (Poli ácido láctico) + VitE + bacterinas); PLASon (Poli ácido láctico) + VitE + bacterinas sonicadas).....70
- Figura 6.** Micrografias eletrônicas de PLACon (Poli ácido láctico + VitE + bacterinas) e PLASon (Poli ácido láctico) + VitE + bacterinas sonicadas) não implantados e 182 dias pós-implantação (DPI). **(A)** e **(B)** antes da implantação (A e B; barra = 20 μ m; A e B insete barra = 10 μ m). **(C)** artefato circular aderido à superfície do dispositivo PLACon (seta branca) 182 DPI (C; bara = 20 μ m; C insete; barra = 10 μ m) e **(D)** superfície do dispositivo PLASon 182 DPI. **(D inset)** superfície do PLASon com artefatos aderidos a depressões (cabeça de seta) 182 DPI (C e D; bara = 20 μ m; C e D insete barra = 10 μ m).....71
- Figura 7.** Espectros no infravermelho dos dispositivos de Poli(ácido Láctico) (PLA) acrescidos de vitamina E contendo bacterinas ou bacterinas sonicadas (PLACon e PLASon) implantados por 126 e 182 dias ou não, PLA acrescido com vitamina E (PLA + VE) e PLA puro. **(A)** Espectros na faixa de 3800 a 1250 cm^{-1} e **(B)** espectros na faixa de 1800 a 1250 cm^{-1} . As linhas guia sinalizam os grupamentos químicos relacionados às bandas de absorção correspondentes no eixo x.....72

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 láctico (monômero) é produzido a partir de recursos renováveis por meio da fermentação bacteriana do amido. A polimerização dos monômeros de ácido láctico por abertura de anel produzirá o Poli(ácido láctico) (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) demonstraram por meio de técnica imunohistoquímica 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 láctico) 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.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Aeromonas hydrophila* (Ah)

Aeromonas hydrophila (Ah) é um bacilo facultativo anaeróbio Gram-negativo, em forma de bastonete, possui cápsula, flagelos móveis polares e não formam esporos. Apresenta crescimento em meios simples, colônias arredondadas, brilhantes e de coloração creme, de 1 a 3 mm de diâmetro a 25°C, durante 48 horas, (Alexandrino et al., 2000; Fernandes et al., 2019a). É uma bactéria aquática comensal e cosmopolita que pode infectar peixes, mamíferos e humanos. Causa gastroenterite, celulite, peritonite, meningite e pneumonia em animais (Fernandes et al., 2019a).

O estresse, principalmente provocado por condições ambientais e fisiológicas adversas como, alterações bruscas de temperatura, elevadas densidades de estocagem, poluição orgânica, hipóxia, é considerado fator predisponente ao aparecimento da doença causada por esta bactéria (Belo et al., 2013). A infecção é caracterizada por aderência da bactéria na pele e nadadeiras, com a colonização bacteriana são observadas úlceras cutâneas e lesões hemorrágicas nas nadadeiras. Esses sinais clínicos estão associados ao início de resposta inflamatória sistêmica, logo, a disseminação sistêmica aos órgãos vitais causam falência múltipla de órgãos e morte do hospedeiro (Parker e Shaw, 2011; Stratev et al., 2015).

Um polissacarídeo capsular bacteriano atua no bloqueio físico e a enzima dismutase bloqueia quimicamente a atividade fagolisossômica da célula alvo. Estes fatores estão envolvidos no mecanismo de evasão bacteriana, resultando em sobrevivência intracelular dentro do fagócito do hospedeiro. Lipopolissacarídeo, exotoxinas, enzimas extracelulares, fímbrias e flagelos são fatores de virulência bacterianos que podem facilitar o contágio, sendo importantes elementos de virulência bacteriana (Zhang et al., 2003; Tomás, 2012).

2.2 Streptococcus agalactiae (Sta)

Streptococcus agalactiae (Sta) um coco Gram-positivo, catalase e oxidase negativo, podendo ou não ser hemolítico. Microrganismo cosmopolita, comensal capaz de infectar uma grande variedade de espécies, incluindo peixes, répteis, anfíbios, aves, mamíferos e humanos. Em humanos, tem prevalência etiológica em meningite bacteriana neonatal e endocardite e pneumonia em adultos (Mian et al., 2009; Asencios et al., 2016; Eto et al., 2018).

Ambiente adverso, suscetibilidade do hospedeiro e interação com o patógeno definem a patogênese da infecção por *Streptococcus*, em que o grupo B Sta geralmente são isolados em surtos no Brasil, ocasionando alta morbidade e mortalidade em peixes, sendo a tilápia do Nilo é um dos teleósteos mais afetados por *Streptococcus* sp (Salvador et al., 2005; Klesius et al., 2006).

Os sinais clínicos incluem perda apetite, exoftalmia, hemorragia ocular, opacidade da córnea, abdome distendido, curvatura da medula espinhal, natação errática, rigidez e sangramento na base das barbatanas (Pulido e Iregui, 2010). Esse microrganismo coloniza o tecido cardíaco lesando as fibras cardíacas e o tecido nervoso central, causando meningite supurativa resultando em sequelas graves no peixe. Cápsula polissacarídica, pili, proteínas ricas em serina, β -hemolisina, citolisina, fibronectina e ácido teicóico contribuem para a sobrevivência intracelular e estão relacionados aos fatores de virulência pois, ocorre migração de Sta da circulação sistêmica para o sistema nervoso central (SNC) (Eto et al., 2018).

Asencios et al. (2016) reportaram o primeiro caso identificando o Sta por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) em infecção natural de 15 tilápias do

Nilo no Peru. Os achados histopatológicos mais importantes foram, epicardite do tipo fibrina supurativa aguda ou crônica (68,75%); miocardite supurativa (31,25%); meningite supurativa aguda (62,5%). Além disso, outras alterações são citadas na infecção por *Sta* como, presença de pigmento disperso nas células epiteliais (75%), necrose de coagulação no músculo (87,5%), necrose e infiltração mononuclear no fígado (56,25%), hiperplasia e fusão da lamela secundária (75%), congestão (31,25%), linfocitose (37,50%), degeneração gordurosa e hidrópica (50%). Esses resultados demonstram que a correlação entre os achados histopatológicos associados ao diagnóstico molecular fornece suporte fundamental para identificação e tratamento desta enfermidade.

2.3 Poli(Ácido Lático) (PLA) – biodegradação, bioreabsorção e biocompatibilidade

Os biopolímeros podem ser classificados de acordo com European Bioplastics como, de base biológica, biodegradáveis ou ambos. Estes materiais possuem as mesmas propriedades dos materiais convencionais, porém, são produzidos com matérias primas de primeira geração como milho e cana-de-açúcar, ricas em carboidratos. As matérias primas de primeira geração são mais eficientes pois requerem menores áreas e apresentam maiores rendimentos.

Existem três grupos principais de biopolímeros; i) não biodegradáveis oriundos de base biológica como o Politereftalato de etileno (PET) ou parcialmente de base biológica como Polietileno (PE), Polipropileno (PP); ii) base biológica e biodegradáveis, como Poli(ácido lático) (PLA), Polihidroxialcanoatos (PHA) ou Polibutileno succinato (PBS) e iii) oriundos de recursos fósseis e biodegradáveis, como o Poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) ou Poli(ϵ -caprolactona).

Esses biopolímeros sofrem degradação e biodegradação, como por exemplo o PLA, apresentando diversas possibilidades de utilização (Shah et al., 2008; Nampoothiri et al., 2010; Castro-Aguirre et al., 2016).

Como possível equivalente aos polímeros e ao biopolímero produzido a partir do petróleo como por exemplo, a Poli(ϵ -caprolactona), a relevância do ácido lático

elaborado a partir de fontes renováveis, chamou a atenção de pesquisadores na década de 90 (Castro-Aguirre et al., 2016). O desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para produção do ácido láctico iniciados nos anos 90 seguindo até os anos 2000, demonstraram que a fermentação bacteriana é vantajosa em comparação à outras formas de sintetizar o ácido láctico como a hidrólise ácida e a oxidação do propileno glicol (Nampoothiri et al., 2010; Castro-Aguirre et al., 2016).

Nesse contexto, as vantagens obtidas a partir da produção fermentativa estão na obtenção dos enantiômeros D (-) e L(+), tendo em vista que, mamíferos e peixes produzem o isômero L (+). Além disso, a fermentação apresenta baixo custo de produção por utilizarem pouca energia e temperatura e ainda, bactérias do gênero *Lactobacilli sp* produzem apenas ácido láctico (Garlotta, 2001; John et al., 2007; Sampaio; Freire, 2016). A capacidade de produção isômero L-ácido láctico por meio químico é limitada, uma vez que, durante o processo de polimerização há formação de *meso*-láctico, comprometendo biodegradação, cristalinidade e estabilidade térmica (John et al., 2007; Castro-Aguirre et al., 2016).

Garlotta, (2001) descreve que a polimerização do ácido láctico para produção do PLA é realizada por policondensação direta, polimerização por abertura de anel ou condensação e desidratação azeotrópica. Tais processos resultam na síntese de L-lactato (Poli(L-ácido láctico); PLLA), D-lactato (Poli(D-ácido láctico); PDLA) ou L, D-lactato (Poli(L,D-ácido láctico); PLDLA).

O PLA (PLLA, PDLA, PLDLA) pode sofrer a quebra das macromoléculas por reações químicas como hidrólise, enzimática ou ambas ao mesmo tempo (Leroy et al., 2017). A proporção do monômero D-ácido láctico, atribui ao PLA característica de ser um poliéster com menor cristalinidade (Garlotta, 2001). A degradação do PLA por meio de testes *in vitro*, podem elucidar como as cadeias do polímero serão quebradas, monitorando parâmetros como, temperatura, cristalinidade (Gorrasi; Pantani, 2013; Xu; Crawford; Gorman, 2011), tempo (Li et al., 2016) e pH (Xu; Crawford; Gorman, 2011).

Grande parte dos estudos relacionados a hidrólise do PLA é realizada a 37°C, relatada como temperatura padrão para ensaios *in vitro* (Leroy et al., 2017) sendo também, a temperatura média corporal da maioria dos mamíferos. Porém, a degradação completa do Poli(ácido láctico) ocorre aproximadamente em dois anos

(Ikada; Tsuji, 2000; Garlotta, 2001) em condições fisiológicas (a 37 °C). Assim, são realizados experimentos utilizando temperaturas de até 90°C (De Santis; Pantani, Titomanlio, 2011). A degradação acelerada (90°C) pode gerar subprodutos do PLA em uma semana, apontados como bons representantes do processo de degradação em temperatura fisiológica (Leroy et al., 2017).

O estudo da cinética de cristalização utilizando técnicas como calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Oliveira et al., 2016) é de grande importância por influenciar nas propriedades físicas, mecânicas e de degradabilidade (De Santis; Pantani, Titomanlio, 2011). O FTIR para análise de cristalinidade quando comparada a outras técnicas apresenta vantagens, por ser uma técnica rápida para determinação da cristalinidade, da estrutura cristalina e não ser destrutiva. Entretanto, apresenta desvantagens na correta identificação de bandas relativas ao conteúdo das fases amorfo e cristalino, dificultando a determinação da proporção exata do coeficiente de absorção entre elas (Partini; Pantini, 2007).

De outra forma, a biodegradação pode ser avaliada por testes *in vitro* que proporcionem condições experimentais semelhantes a processos fisiológicos, em que, os meios utilizados são idênticos aos fluidos corporais ou proporcionem atividade biológica equivalente aos testes *in vivo*. Uma vez que tais processos causem a ruptura das cadeias poliméricas, ato contínuo, sendo esses biodegradados em dióxido de carbono, metano, água e compostos inorgânicos os polímeros como o PLA recebem a classificação de biodegradáveis (Vert, 2009; Silva et al., 2018).

Considerando os testes *in vivo*, o PLA é classificado como bioreabsorvível pois, após a biodegradação os subprodutos são assimilados ou eliminados, por vias inalatória, renal ou inserção em processos bioquímicos (Labet e Thielemans, 2009; Malikmammadov et al., 2018).

Em princípio, os biopolímeros relativamente hidrofóbicos apresentam hidrofilicidade nas extremidades da cadeia polimérica por efeito do ácido carboxílico. Assim, a biodegradação pode ser dividida em quatro fases. Inicialmente, ocorre a hidratação do biomaterial por absorção de água do tecido circundante. A despolimerização por hidrólise das extremidades causa redução da massa molar do

polímero e dessa forma o biomaterial perde energia coesiva entre as macromoléculas, caracterizando a segunda e terceira fases respectivamente. Logo, os fagócitos assimilam pequenos fragmentos de cadeia polimérica resultado da assimilação ou dissolução do polímero, caracterizando a quarta fase. Por fim, o piruvato resultante da bioconversão dos monômeros entram no ciclo de Krebs, em que são novamente convertidos em água e dióxido de carbono, sendo excretado por via pulmonar e/ou renal (Onuma e Serruys, 2011).

O termo biocompatível é dado ao Poli(ácido lático) por ser capaz de interagir com tecido em que é implantado, não causar toxicidade ou reação imunológica exacerbada (Ramot et al., 2018). À vista disso, as características de biodegradação, biocompatibilidade e bioreabsorção classificam o PLA como biomaterial, por proporcionar aplicação *in vivo* para tratamento, substituição de tecido e aplicações específicas (Labet e Thielemans, 2009).

As propriedades químicas e mecânicas estimularam pesquisadores a misturar (blendas poliméricas) o PLA a outros biopolímeros (Dias; Chinelatto, 2019) e a outros compostos como a vitamina E (Mu; Feng, 2002), de mesmo modo, a moldar em diversas formas para inúmeras finalidades como, “stents” coronarianos (Buscemi et al., 2017), enxerto de pele (Blackstone et al., 2018), parafusos bioabsorvíveis (Felfel et al., 2013), suporte para o reparo da medula espinhal (Patist et al., 2004), controle de neuropatias periféricas (Sun et al., 2006) e microesferas para liberação controlada de vacinas (Pavot et al., 2014).

Quando implantados, os dispositivos elaborados a partir de um biopolímero ou de uma blenda, desencadeiam resposta inflamatória iniciada pela cascata de coagulação, sistema complemento e adesão plaquetária. Esse processo inicial é descrito como efeito Vroman em que ocorre a adsorção de proteínas para formação e composição de uma matriz provisória, sendo as propriedades físico-químicas da superfície do biomaterial e a composição do plasma sanguíneo importantes para esse processo. Estes eventos iniciais (resposta inata) resultam na ativação de polimorfonucleares, monócitos e macrófagos residentes (Williams, 2008; Rambo et al., 2008; Franz et al., 2011).

A albumina, proteínas presente no soro sanguíneo é descrita como de alta mobilidade, assim, é adsorvida primeiro. Rapidamente são substituídas por proteínas

menos móveis na superfície específica do biopolímero como, fibrinogênio, cininogênio, fibronectina e vitronectina. A quantidade adsorvida de vitronectina e fibronectina na superfície do biomaterial é fundamental para a adesão de monócitos e formação de células gigantes por interação mediada por integrinas (Anderson, 2001; Gorbet; Sefton, 2004; Klopffleisch; Jung, 2017).

A resposta inflamatória, biocompatibilidade, taxa de degradação e biorreabsorção dos biomateriais podem ser alteradas. Local de implantação (p.ex tecido subcutâneo, intramuscular ou intraperitoneal), espécie do hospedeiro e microambiente são considerados como fatores extrínsecos. Assim, são elencados como fatores intrínsecos aos biopolímero como a forma, massa molar, cristalinidade, composição química estereoisométrica e rugosidade superfície, porosidade, morfologia resultante do tamanho e geometria do suporte desenvolvido, tensão mecânica, esterilidade e duração do contato (Fournier et al., 2003; Barbanti et al., 2005; Ramot et al., 2016). A combinação desses fatores (intrínsecos e extrínsecos) ditam as características de biocompatibilidade, bioreabsorção e taxa de degradação do material implantado.

3. IMPLICAÇÕES

De fato, as infecções por *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* causam prejuízo econômico em decorrência da alta letalidade e a vacinação adequada é considerada estratégia para o aumento da sobrevivência e diminuição do uso de antibióticos na produção (Delphino et al., 2019a). A rápida disseminação destes agentes em pele, fígado, rins, baço, guelra, coração e cérebro após 48 horas de inoculação, comprova a alta patogenicidade (Salvador et al., 2012; Eto et al., 2018; Fernandes et al., 2019b).

Esquemas vacinais variados em peixes são reportados na literatura demonstrando segurança comprovada pela titulação de anticorpos na primeira semana após imunização. Quando imunizados para *Aeromonas Hydrophila* os títulos de anticorpos se mantêm por até 10 semana sem decréscimo na titulação (Aly et al., 2015). A imunização para *Streptococcus Agalactiae* apresenta uma efetividade parcial

e pouco duradoura, apresentando redução na titulação de anticorpos três semanas após a imunização (Evans et al., 2004; Noraini; Sabri, 2013).

Costa e colaboradores (2017) levantaram os custos e tempo de produção de tilápias de 0,5 g até o peso de abate 1000 g no estado de São Paulo. Neste estudo, os pesquisadores levaram em consideração a amplitude térmica, o que implica em períodos maiores para que o animal chegue ao ponto de abate. Foram estudados 8 ciclos, em média são necessários 8 meses da fase inicial até o momento do abate das tilápias.

O PLA vem sendo estudado como veículo vacinal para imunização de uma série de agentes infecciosos como, tétano (Raghuvanshi et al., 2002), difteria (Johansen et al., 1999), hepatite B (Saini et al., 2010) e HIV (Guillon et al., 2007). O interesse em utilizar PLA como veículo está na reação imune adaptativa que é induzida no hospedeiro assim que o ocorre a implantação.

Nesse campo, a vitamina E (VitE) pode ser utilizada como emulsificante na produção de nanoesferas substituindo o emulsificante tradicional poli(vinil álcool). Além disso, no processo de produção de nanoesfera para entrega de fármacos a VitE encapsula e protege o fármaco durante o processo de produção (Mu; Feng, 2002). Ademais, melhora a bioestabilidade e biocompatibilidade de diferentes biomateriais, em particular, do PLA (Pittarella et al., 2014).

A VitE apresenta atividade anti-inflamatória é um antioxidante biológico natural e quando utilizada no processo de produção de dispositivos é absorvida no trato gastrointestinal favorecendo o paciente (Mu; Feng, 2002). Quando utilizada na dieta de peixes a VitE contribui no mecanismo de resposta inflamatória aumentando a atividade cinética de recrutamento de macrófagos e formação de células gigantes em reações de corpo estranho. Podendo atuar ainda na resposta ao estresse reduzindo a imunossupressão relacionada ao estresse (Belo et al., 2005).

A reação inflamatória causada pela presença do biomaterial, ativa a cascata de coagulação e o recrutamento de polimorfonucleares (PMN) que se aderem ao biomaterial. Macrófagos, monócitos, células dendríticas, células T são recrutados para o processo de degradação, além de serem as principais células apresentadoras de antígenos (Franz et al., 2011).

A degradação completa do PLA depende do tamanho do dispositivo, massa molecular e espessura, levando até 24 meses para ser totalmente reabsorvido (Garlotta, 2001; Fournier et al., 2003). Nesse contexto, a degradação hidrolítica do dispositivo polimérico é dependente do seu tamanho e espessura. Logo, a taxa de degradação do núcleo é maior do que a degradação da superfície do dispositivo, tem-se então, uma degradação heterogênea. Diferentemente, em dispositivos menores a taxa de degradação ocorre de forma homogênea, assim, a degradação do núcleo é equivalente à da superfície (Anderson; Shive, 2012).

A possibilidade de prolongar a exposição aos antígenos vacinais utilizando o PLA e dentro gama de possibilidades em modelar o biomaterial para melhor ser utilizado, foi proposto neste primeiro estudo já publicado (Cap. 2). Avaliou-se a segurança clínica e toxicológica de dispositivos modelados a partir da dissolução do PLA em diclorometano acrescido na dissolução vitamina E. Além da publicação, o processo de modelação e incorporação de vitamina E ao biomaterial (2,3 mm de diâmetros) foi reconhecida como inovação atendendo as condições de patenteabilidade pela Agência Unesp de Inovação (AUIN) e depositado para avaliação no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) registrado sob processo BR 10 2020 026197 5.

Além disso, a possibilidade de adicionar outras substâncias orgânicas ao processo de produção do dispositivo, fizeram com que, além da vitamina E fosse acrescentada as duas bactérias com intuito de ser utilizado como uma vacina polivalente visto que não há um imunizante para a cadeia produtiva aquícola nessa apresentação (Cap. 3). Dessa forma, a liberação lenta de antígenos proporcionada pelo PLA e a possibilidade de utilização dos dois agentes infecciosos como *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* poderá auxiliar no incremento de resposta imune inata, aumentando a capacidade de proteção dos animais contra os patógenos durante o período de criação.

4. REFERÊNCIAS

Alexandrino AC, Okumura MPM, Baldassi L, Araujo AP, Kuroda, CK, Wakasa YS (2018) Ocorrência de *Aeromonas hydrophila* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intensivo–relato de caso. **Boletim do Instituto de Pesca**, 26: 117-119.

Aly SM, Albutti AS, Rahmani AH, Atti NMA (2015) The response of New-season Nile tilapia to *Aeromonas hydrophila* vaccine. **International journal of clinical and experimental medicine**, 8: 4508.

Anderson JM (2001) Annual Rev Mat Res. **Biological responses to materials**, 31: 81-110.

Anderson JM, Shive MS (1997) Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced drug delivery reviews**, 28: 5-24.

Asencios YO, Sánchez FB, Mendizábal HB, Pusari KH, Alfonso HO, Sayán AM, Chaupe NS (2016) First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. **Aquaculture reports**, 4: 74-79.

Barbanti SH, Zavaglia CA, Duek EA (2005) Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, 15: 13-21.

Behera T, Nanda PK, Mohanty C, Mohapatra D, Swain P, Das BK, Sahoo SK (2010) 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 Immunology**, 28: 320-325.

Belo MAA, Souza DGF, Faria VP, Prado EJ, Moraes FR, Onaka EM (2013) Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. **Journal of fish biology**, 82: 1403-1410.

Belo MADA, Moraes JRED, Soares VE, Martins ML, Brum CD, Moraes FRD (2012) Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47: 1015-1021.

Bioplastics Materials. Disponível em: <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/materials/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

Blackstone BN, Hahn JM, McFarland KL, DeBruler DM, Supp DM, Powell HM (2018) Inflammatory response and biomechanical properties of coaxial scaffolds for engineered skin in vitro and post-grafting. **Acta biomaterialia**, 80: 247-257.

Buscemi S, Palumbo VD, Maffongelli A, Fazzotta S, Palumbo FS, Licciardi M, Lo Monte, AI (2017) Electrospun PHEA-PLA/PCL scaffold for vascular regeneration: a preliminary in vivo evaluation. **Transplantation Proceedings** 49: 716-721.

Castro-Aguirre E, Iniguez-Franco F, Samsudin H, Fang X, Auras R (2016) Poly (lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. **Advanced drug delivery reviews**, 107: 333-366.

Costa JID, Sabbag OJ, Ayroza LMDS, Martins MIEG (2017) Productive performance and economic evaluation of tilapia stocked in different times of the year. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 46: 553-559.

Cutright DE, Hunsuck EE (1971) Tissue reaction to the biodegradable polylactic acid suture. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, 31: 134-139.

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

De Santis, F., Pantani, R., & Titomanlio, G. (2011). Nucleation and crystallization kinetics of poly (lactic acid). *Thermochimica acta*, 522(1-2), 128-134.

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

Delphino MK, Barone RS, Leal CA, Figueiredo HC, Gardner IA, Gonçalves VS (2019b) Economic appraisal of vaccination against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia farms in Brazil. **Preventive veterinary medicine**, 162: 131-135.

Dias PDP, Chinelatto MA (2019) Effect of poly (ϵ -caprolactone-b-tetrahydrofuran) triblock copolymer concentration on morphological, thermal and mechanical properties of immiscible PLA/PCL blends. **Journal of Renewable Materials**, 7: 129-138.

Eto SF, Fernandes DC, Moraes AC, Prado EJR, Baldassi AC, Manrique WG, Pizauro JM (2018) Validation of IgY for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae*-caused endocarditis and bacterial meningitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & shellfish immunology**, 76: 153-160.

Evans JJ, Klesius PH, Shoemaker CA (2004) Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. **Vaccine**, 22: 3769-3773.

Felfel RM, Ahmed I, Parsons AJ, Rudd CD (2013) Bioresorbable composite screws manufactured via forging process: pull-out, shear, flexural and degradation characteristics. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, 18: 108-122.

Fernandes DC, Eto SF, Moraes AC, Prado EJR, Medeiros AS, Belo MA, Pizauro JM (2019a) Phagolysosomal activity of macrophages in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected in vitro by *Aeromonas hydrophila*: infection and immunotherapy. **Fish & Shellfish Immunology**, 87: 51-61.

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

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

Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC (2011) Immune responses to implants—a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. **Biomaterials**, 32: 6692-6709.

Garlotta D (2001) A literature review of poly (lactic acid). **Journal of Polymers and the Environment**, 9: 63-84.

Gorbet MB, Sefton MV (2004) Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. **Biomaterials**, 25: 5681-5703.

Gorrasi G, Pantani R (2013) Effect of PLA grades and morphologies on hydrolytic degradation at composting temperature: Assessment of structural modification and kinetic parameters. **Polymer degradation and stability**, 98: 1006-1014.

Guillon C, Mayol K, Terrat C, Compagnon C, Primard C, Charles MH, Verrier B (2007) 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**, 25: 7491-7501.

Ikada Y, Tsuji H (2000) Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. **Macromolecular rapid communications**, 21: 117-132.

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

John RP, Nampoothiri KM, Pandey A (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, 74: 524-534.

Kastellorizios M, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ (2015) Prevention of foreign body reaction in a pre-clinical large animal model. **Journal of Controlled Release**, 202: 101-107.

Klesius P, Evans J, Shoemaker C, Yeh H, Goodwin AE, Adams A, Thompson K (2006) Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique. **Aquaculture**, 258: 180-186.

Klopfleisch R, Jung F (2017) The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. **Journal of biomedical materials research Part A**, 105: 927-940.

Labet M, Thielemans W (2009) Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical society reviews**, 38: 3484-3504.

Leleux J, Roy K (2013) Micro and nanoparticle-based delivery systems for vaccine immunotherapy: an immunological and materials perspective. **Advanced healthcare materials**, 2: 72-94.

Leroy A, Ribeiro S, Grossiord C, Alves A, Vestberg RH, Salles V, Bayon, Y (2017) FTIR microscopy contribution for comprehension of degradation mechanisms in PLA-based implantable medical devices. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 28: 1-13.

Li MX, Kim SH, Choi SW, Goda K, Lee WI (2016) Effect of reinforcing particles on hydrolytic degradation behavior of poly (lactic acid) composites. **Composites Part B: Engineering**, 96: 248-254.

Malikmammadov E, Tanir TE, Kiziltay A, Hasirci V, Hasirci N (2018) PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, 29: 863-893.

McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW (2018) Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. **Disease models & mechanisms**, 11: dmm033084.

Mian GF, Godoy DT, Leal CAG, Yuhara TY, Costa GM, Figueiredo HCP (2009) Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary microbiology**, 136: 180-183.

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

Nampoothiri KM, Nair NR, John RP (2010) An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresource technology**, 101: 8493-8501.

Noraini O, Sabri MY, Siti-Zahrah A (2013) Efficacy of spray administration of formalin-killed *Streptococcus agalactiae* in hybrid Red Tilapia. **Journal of aquatic animal health**, 25: 142-148.

Oliveira M, Santos E, Araújo A, Fachine GJ, Machado AV, Botelho G (2016) The role of shear and stabilizer on PLA degradation. **Polymer testing**, 51: 109-116.

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

Parker JL, Shaw JG (2011) *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**, 62: 109-118.

Partini M, Pantani R (2007) Determination of crystallinity of an aliphatic polyester by FTIR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, 59: 403-412.

Patist CM, Mulder MB, Gautier SE, Maquet V, Jérôme R, Oudega M (2004) Freeze-dried poly (D, L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. **Biomaterials**, 25: 1569-1582.

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

Pittarella P, Antonioli D, Rizzi M, Laus M, Renò F (2014) Vitamin E acetate addition to poly (d, l) lactic acid modifies its mechanical behavior without affecting biocompatibility. **Journal of Applied Polymer Science**, 131.

Pulido EA, Iregui CA (2010) HibRIDACIÓN in situ PARA LA deteCCción de streptococcus agalactiae eN tejidos de tILAPiA (oreochromis sp.). **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, 57: 11-22.

Raghuvanshi RS, Katare YK, Lalwani K, Ali MM, Singh O, Panda AK (2002) Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. **International journal of pharmaceutics**, 245: 109-121.

Rambo CR, Recouvreux DOS, Carminatti CA, Pitlovanciv AK, Antônio RV, Porto LM (2008) Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, 28: 549-554.

Ramot Y, Haim-Zada M, Domb AJ, Nyska A (2016) Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. **Advanced drug delivery reviews**, 107: 153-162.

Saini V, Jain V, Sudheesh MS, Dixit S, Gaur RL, Sahoo MK, Kohli D (2010) 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. **Journal of drug targeting**, 18: 212-222.

Salvador R, Muller EE, Freitas JCD, Leonhardt JH, Pretto-Giordano LG, Dias JA (2005) Isolation and characterization of Streptococcus spp. group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, 35: 1374-1378.

Salvador R, Toazza CS, De Moraes JRE, De Moraes FR (2012) Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement. **Diseases of Aquatic Organisms**, 98: 235-241.

Sampaio FD, Freire CA (2016) An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. **Fish and Fisheries**, 17: 1055-1072.

Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S (2008) Biological degradation of plastics: a comprehensive review. **Biotechnology advances**, 26: 246-265.

Stratev D, Stoev S, Vashin I, Daskalov H (2015) Some varieties of pathological changes in experimental infection of carps (*Cyprinus carpio*) with *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research**, 1: 191-202.

Sun H, Mei L, Song C, Cui X, Wang P (2006) The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. **Biomaterials**, 27: 1735-1740.

Tomás JM (2012) The main *Aeromonas* pathogenic factors. *International Scholarly Research Notices*, 2012: 1-22.

Valenti WC, Barros HP, Moraes-Valenti P, Bueno GW, Cavalli RO (2021) Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, 19: 100611.

Vert M (2009) Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 20: 437-446.

Williams DF (2008) On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, 29: 2941-2953.

Xu L, Crawford K, Gorman CB (2011) Effects of temperature and pH on the degradation of poly (lactic acid) brushes. **Macromolecules**, 44: 4777-4782.

Zhang YL, Lau YL, Arakawa E, Leung KY (2003) Detection and genetic analysis of group II capsules in *Aeromonas hydrophila*. **Microbiology**, 149: 1051-1060.

Capítulo 2 - Device implant based on poly(lactic acid) with vitamin E for vaccine delivery system in Tilapia: Study for biocompatibility and biodegradation

Artigo publicado na revista Fish and Shellfish Immunology Reports, intitulado “Device implant based on poly(lactic acid) with vitamin E for vaccine delivery system in Tilapia: Study for biocompatibility and biodegradation”, volume 3, páginas 100060, 2022.

Abstract

The use of Poly(lactic acid) (PLA) as a slow-release vehicle for vaccines has attracted the attention of researchers, since its insertion improves the uptake of them, and reduces side effects or by stimulating recruited defense cells, assisting immunity without the need for booster vaccine doses. Seeking to develop new strategies for the administration of drugs and vaccines in aquaculture, we evaluated the biocompatibility and biodegradation of polymeric PLA devices and PLA plus vitamin E devices, implanted through subcutaneous (SC) and intraperitoneal (IP) routes in Nile tilapia. To carry out this study, 84 male tilapia (initial $243.82 \pm 56.74\text{g}$; final $400.71 \pm 100.54\text{g}$) were randomly distributed in 3 tanks ($n=28$ fish per treatment/tank). The devices were prepared in two formulations: neat PLA (containing 100% PLA) and PLAVE (PLA plus vitamin E) implanted using a commercial AnimalTag® applicator, and non-implanted fish (control). Fish were sampled 15, 30, 60, and 120 days post-implantation (DPI). Blood analysis was used to access blood cells and blood smear for differential leucocytes count. Serum biochemistry to evaluated changes in serum proteins and glycemia. Histopathological investigation using hematoxylin-eosin (H&E) was used to assess polymer-tissue interaction. Histochemistry and immunohistochemistry was used to detection immune cells and phagocytes in capsule, and analyses of melanomacrophage centers (MMCs) to morphometric evaluation and percentage amount of melanin, hemosiderin and lipofuscin pigments. Histopathological study revealed an increase of capsular formation and inflammatory cell infiltration in PLAVE-

implanted tilapia through SC route (15 DPI). Tilapia implanted with PLAVE and PLA (SC) presented mast cells and eosinophilic granular cells during 15, 30, and 60 DPI, with a decrease in these cells in the fibrous capsule around the polymer at 120 DPI. PLAVE implanted tilapia SC at 60 DPI showed significantly phagocytosis points than other groups. Phagocytic cells (F4/80+) were observed near to biopolymers in phagocytosis sites. Lipofuscin at 120 DPI in spleen melanomacrophage centers were significantly high in PLAVE implanted tilapias when compared to fish with PLA implants and control. The serum biochemical study of tilapia did not reveal changes in cytotoxicity and liver function in implanted fish. The absence of side effects in hematological and biochemical findings, including the absence of mortality after device implantation, proves its clinical safety. PLA implants in tilapia have demonstrated biocompatibility, biodegradation, clinical safety, and excellent evolution of foreign body inflammatory responses.

Keywords: Biomaterials, *Oreochromis niloticus*, Clinical safety, Inflammatory response, Innate immunity

1. Introduction

The use of biomaterials from renewable sources has been growing in several biomedical segments, among them, the poly(lactic acid) (PLA) has shown great interest in scientific community, since it has been used as bone fixation material [1], coronary stents [2], tissue engineering [3], drug, and vaccine-carrying microspheres [4;5;6]. Other authors have studied the biocompatible and biodegradable of pure PLA and PLA with other polymers called blends and, whit another compounds, suggesting that the PLA is safety [7;8;9]. The PLA was approved by the FDA in 1971 for the development of sutures. After implantation the product of the biodegradation by phagocytosis results in the transformation of L-lactate monomer in pyruvate, which is a substrate for the Krebs cycle and oxidative phosphorylation, resulting in the production of carbon dioxide and water, and both are easily excreted by the body [10].

Vaccines with PLA-based vehicles may have advantages, as they result in prolonged inflammatory stimuli with the accumulation of defense cells recruited to the

implant site [11;12]. Franz et al. [13] described the implantation of PLA activates the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and through macrophages, dendritic cells, and pattern recognition receptors (PRR) to promote inflammation and immunity. The long period of PLA degradation may keep the antibody titers elevated favoring the animal against opportunistic pathogens such as the case of *Streptococcus agalactiae* and *Aeromonas hydrophila* in tilapia farms, without the need for reinforcement vaccine doses, reducing handling stress, and production costs [4;14;15;16].

The preparation of polymers as vaccine carriers in mammals [8;17] and fish [18] is carried out using oil-in-water (o / w) emulsion methodology and most commonly water-oil-water (w / o / w) in which the antigen or the active molecule is soluble in a non-water-miscible solvent, such as dichloromethane (DCM). A common step for both techniques is the dispersion of the polymer in an aqueous phase containing the emulsifier poly(vinyl alcohol) [4]. Researchers proposed the use of natural emulsifiers for the preparation of microspheres for the distribution of drugs, among them vitamin E [19;20]. The process of producing microspheres using vitamin E is easier to manufacture and is also more effective in the encapsulation process [20].

Schubert et al. [21] demonstrated that the use of vitamin E incorporated into poly(etherurethane urea) implanted subcutaneously in rats improves biocompatibility and stimulates a greater amount of macrophages adherent to the material during the inflammatory reaction. McNally and Anderson [22] observed that α -tocopherol promoted adhesion with cytoplasmic dissemination, favoring macrophage fusion and formation of foreign body giant cells (FBGC). These authors reported that α -tocopherol contributed to the formation of FBGC in the presence of interleukin-4 (IL-4), and also induced the formation of these giant cells through the activation of diacylglycerol kinase.

Furthermore, vitamin E has important antioxidant activity maintaining the flow of nutrients in phagocytes [23] and favoring the defense mechanisms of fish during the foreign body's chronic inflammatory reaction [24;25]. Vitamin E accumulation in tissues helped to improve immune regulatory response and defense against stressors and infectious pathogens in Nile tilapia by upregulated gene expression in an oral administration [26;27].

Based on the importance of developing new strategies for the administration of drugs and vaccines in aquaculture, we evaluated the biocompatibility (clinical safety) and biodegradation of neat polymeric poly(lactic acid) devices and poly(lactic acid) plus vitamin E, implanted through subcutaneous and intraperitoneal routes in Nile tilapia.

2. Materials and Methods

2.1 Animals and experimental design

To carry out this study, 84 male tilapias ($243.82 \pm 56.74\text{g}$), from Aquabel farm (Porto Ferreira, São Paulo State, Brazil) and belonging to the same spawning, were randomly distributed in 3 tanks (1000 L of water, $n=28$ fish per treatment/tank) with recirculation system at a flow rate of 5 L min^{-1} , to perform the following three treatments: control group (without implant), PLA and PLAVE (PLA with Vitamin E). Fish were reared in this system for 3 months before starting the study with the implantation of biomaterials. Fish were fed 3% of biomass with commercial feed (Nutripiscis® - Neovia Company, 28% GP, and 4000 kcal of GE kg^{-1}). Water quality parameters were determined daily using pHmeter with conductivimeter (model YSI-63) and oximeter (model YSI-55), and their values remained within the adequate range for tropical fish comfort [28] (dissolved oxygen = $4.07 \pm 0.89 \text{ mg L}^{-1}$; temperature = $27.64 \pm 2.05 \text{ }^{\circ}\text{C}$; pH = 7.64 ± 0.54 ; and conductivity = $208.29 \pm 97.57 \text{ }\mu\text{S/cm}$). This research was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals belonging to São Paulo State University, FCAV-UNESP, protocol nº 08665/19.

2.2 Device of poly (lactic acid) and implantation

The devices were prepared in two formulations: neat PLA containing 100% of poly(lactic acid) and PLAVE containing poly(lactic acid) plus vitamin E. Basically, 500 mg of poly(lactic acid) (PLA grade: Ingeo 3251D, manufactured by NatureWorks Co., Ltd) was dissolved in dichloromethane (DCM) stirring for 20 minutes. To produce PLAVE, the same methodology described was used, obtaining the dissolution of PLA, vitamin E was added to the dissolved PLA [20]. Thus, PLA or PLAVE were placed in

glass capillaries maintained at room temperature during four days for drying. The devices were removed from the capillaries and sectioned with one centimeter of length (patent number BR 10 2020 026197 5). Prior to implant, the devices were immersed in 70% ethanol for one hour and dried in an oven [29;30]. Then the fish were anesthetized by immersion in 1: 10.000 (v: v) aqueous solution of benzocaine (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri 63178, USA), and using a commercial AnimalTag® applicator, the same fish receive two devices of PLAVE or PLA implanted intraperitoneally (IP) and subcutaneously (SC).

2.3 Blood analysis

Seven fish per treatment per time (totalized n=28 fish/treatment) were anesthetized (item 2.2) to obtain blood samples from the caudal vessel at 15, 30, 60, and 120 days post-implantation (DPI), using two sets of needle and syringe one coated with lithium heparin and another without anticoagulant to obtain plasma and serum samples, respectively. Blood cell counts were realized by hemocytometer (Neubauer chamber) and Natt and Herrick solution (proportion of 1:100 v:v). The hematocrit (Ht) was determined in microhematocrit centrifugation technique and hemoglobin concentration (Hb) with Drabkin's reagent read at 540 nm. Mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were calculated from the Ht, [Hb], and red blood cells. Blood smears for differential leukocyte counts were stained with a combination of May-Grünwald Giemsa and Wright's Method [31]. After blood sampling, fish euthanasia was carried out by prolonged exposure to benzocaine hydroalcoholic solution 1:500 (v:v).

2.4 Reactive Oxygen Species (NBT assay)

The respiratory burst of leukocytes was measured according to Farias et al. [32]. For that, 100 µL of an NBT-buffered solution at 0,2% (NBT-nitroblue tetrazolium, Sigma, St. Louis, MO, USA) was mixed with 100 µL of heparinized blood. This solution was homogenized and incubated in a dark room for 30 min at 25°C. After the incubation, 50 µL of the solution was added to 1 mL of n,n-dimethyl-formamide (DMF, Sigma, St. Louis, MO, USA), and centrifuged at 3000g for 5 min. The supernatant

optical density was measured using a spectrophotometer (Beckman DU-70S) with a wavelength of 540 nm.

2.5 Serum biochemistry

Fish blood samples without anticoagulant were centrifuged at 3000g for 10 min. at 4 °C to obtain the serum for total protein, alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) determination, using in a semi-automatic biochemical analyzer (Model LabQuest® – Bioplus Company) [33] and fish glycemia was determined using the Accu-Chek Performa device.

2.6 Histopathology

The devices implanted in the SC were removed together with subcutaneous tissue and adjacent skeletal muscle, while the IP implants were collected with the omentum. Therefore, samples of polymeric implants and splenic tissue for melanomacrophage studies were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 5µm, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for photomicroscopic assessment (Carl Zeiss Jena, Germany) and images captured using software (Opton CMOS). An experienced pathologist performed blind histopathologic analyses and the histological findings related to polymeric implants were quantitatively classified using a numerical score: 1-mild reaction, 2-moderate reaction, 3-intense reaction, and 4-severe reaction according to the criteria proposed by De Jong et al. [34].

2.6.1 Eosinophilic granular cells (EGCs) and phagocytosis points count

Histological sections were stained in H&E, for counting evaluation. For this purpose, five fields per animal were randomly selected and photographed (Opton CMOS TA-0124-D) totaling 35 fields per treatment in each evaluated period (15, 30, 60, and 120 DPI), to be determined the area (mm²) the number of eosinophilic granular cell, and phagocytosis points per field were counting using the Image-J program [35]. Number of cells or phagocytosis points were divided by area (cell or phagocytosis / mm²).

2.6.2 Histochemistry and Immunohistochemistry

For detection of immune cells and phagocytes in capsule, histochemistry and immunohistochemistry (IHC) analysis were performed. The Periodic Acid Schiff (PAS) staining was performed to identify the leukocytes-granulocytes infiltrated in capsular tissue. Toluidine blue (1%, pH 4.0) staining was performed to identify mast cells in tissue sections through metachromatically reaction of heparin and sulfated glycosaminoglycan granules. For IHC detection of phagocytes, histological sections were submitted to reaction with the primary antibody F4/80 (rabbit monoclonal, 1:100, D2S9R, #70076, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Slides were dewaxed, and antigens were retrieved in 10 mM citrate buffer (pH 6.0, at 98°C). Endogen peroxidases blocked in 10% H₂O₂, and nonspecific proteins were blocked using 5% skimmed milk. After, they were incubated overnight with the primary antibodies. An incubation with polymer (Novolink Max Polymer DS (1250), Leica) was performed, and detection was performed with 3–30'-diaminobenzidine tetrahydrochloride solution (DAB) and counter-stained with Harris Hematoxylin, staining and inspected under a light microscope (Olympus BX50, Olympus Corporation, Center Valley, PA, USA). Images were captured using Olympus cellSens Standard 1.18 software (Olympus Corporation, Center Valley, PA, USA).

2.7 Analysis of melanomacrophage centers (MMCs)

Spleen histological sections were stained in H&E, toluidine blue, Perl's (hemosiderin - ferric blue pigment), and Schmorl's (lipofuscin - brown pigment) stain for morphometric evaluation and the percentage amount of melanin, hemosiderin, and lipofuscin pigments present in MMCs, following the methodology described by Manrique et al. [36]. For this purpose, five fields per animal were randomly selected and photographed (Opton CMOS TA-0124-D) for each staining, totaling 35 fields per treatment in each evaluated period (15, 30, 60, and 120 DPI), to determined the area (μm^2) and the number of MMCs per field, as well as the percentage of each pigment, using the Image-J program [35].

2.8 Statistical analysis

The data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Data were analyzed using a linear model, which included fixed effects for treatment and treatment-time to implant interaction. Differences between treatments were determined by the Kruskal-Wallis test. All analyzes were carried out using Sigma-Plot, version 12.0. Significant differences ($p < 0.05$) were estimated based on Dunn's test.

3. Results

3.1 Polymeric implants

The first assessment at 15 days post-implantation (DPI) was performed to verify the formation of a moderate capsule with macrophages between the implant and fibrous capsule. In the following evaluations, cytoplasmic projections were observed involving parts of the polymers containing paved macrophages adjacent to the fibrous capsule in subcutaneous (Fig. 1), and intraperitoneal implants (Fig. 2). Neovascularization in the fibrous capsule can be seen with greater intensity at 15 and 30 DPI. However, at 60 and 120 DPI, a notable increase in the diameter of blood vessels and retraction of the capsule was observed with the presence of focal points of phagocytosis and the presence of cells inside the polymer (Fig. 1 and Fig.2).

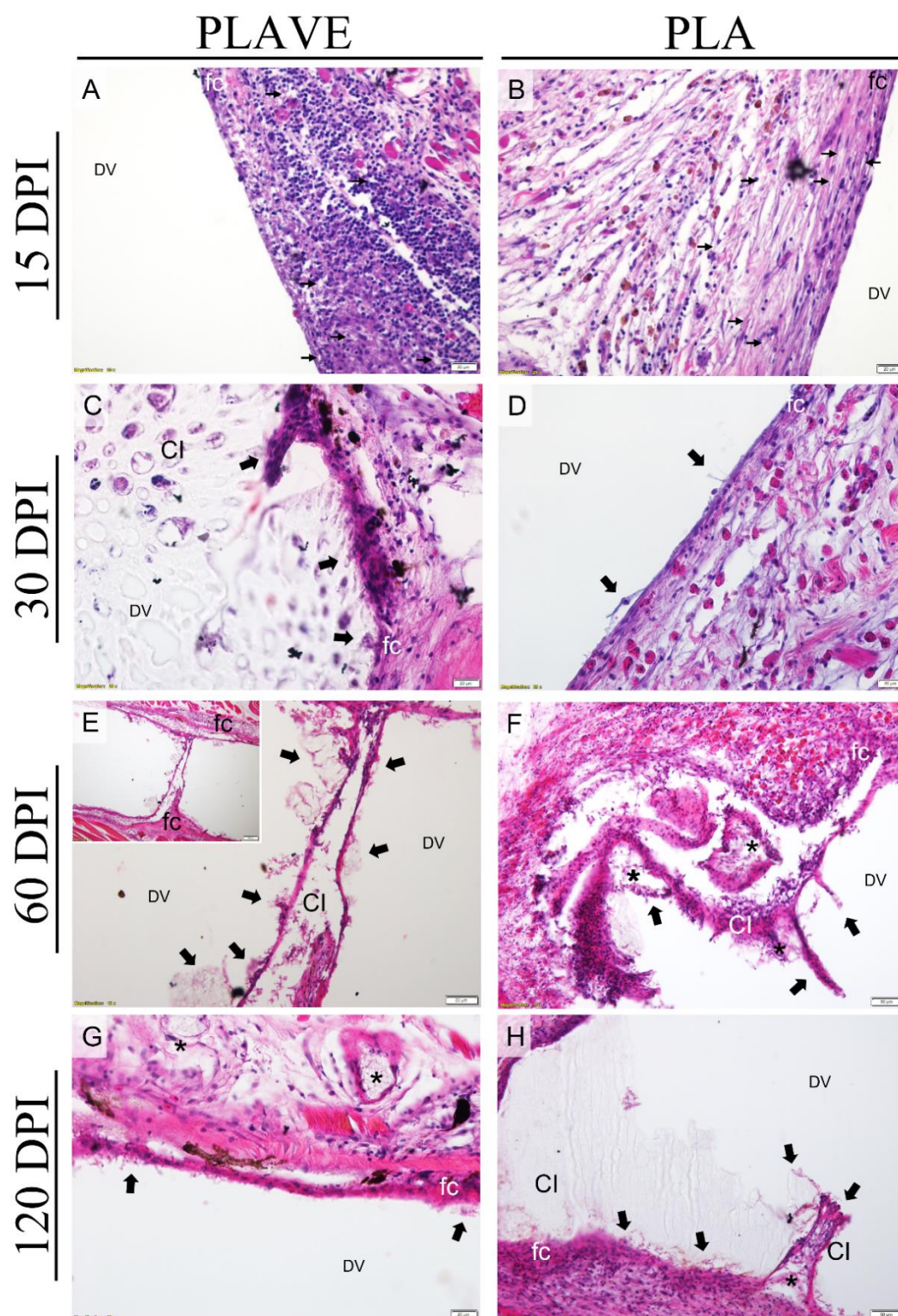


Figure 1. Photomicrographs of PLAVE and PLA subcutaneous implants in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), stained with H&E. **(A - B)** diffuse mononuclear inflammatory infiltrate in the skin tissue adjacent to the fibrotic capsule (fc), neovascularization in the capsule and skin tissue (thin arrows), and in **(B)** presence of the eosinophilic granular cell; (DV) polymer location region (scale bar = 20µm). **(C - D)** fibrotic capsule (fc) with

phagocyte cells paving and tissue projections on the polymer (thick black arrow), and in **(D)** presence of the eosinophilic granular cell in capsule; (CI) cell infiltration within the polymer, (DV) region of polymer location (scale bar = 20 μ m). **(E - F)** fibrotic capsule (fc) with phagocyte cells paving and surrounding the polymer (thick black arrow), and (*) phagocytosis points, (CI) cell infiltration within the polymer, phagocytosis points (*), (DV) polymer localization region (scale bar = 50 μ m). **(E inset)** cell bridge connected to fibrotic capsule (fc) between the ends of the polymer (scale bar = 100 μ m) **(G - H)** fibrotic capsule (fc) with macrophage paving and tissue projections on the polymer (thick black arrow), multinucleated giant cells and phagocytosis points (*), (CI) cell growth within polymer, (DV) polymer location region (D; scale bar = 20 μ m; E; scale bar = 50 μ m).

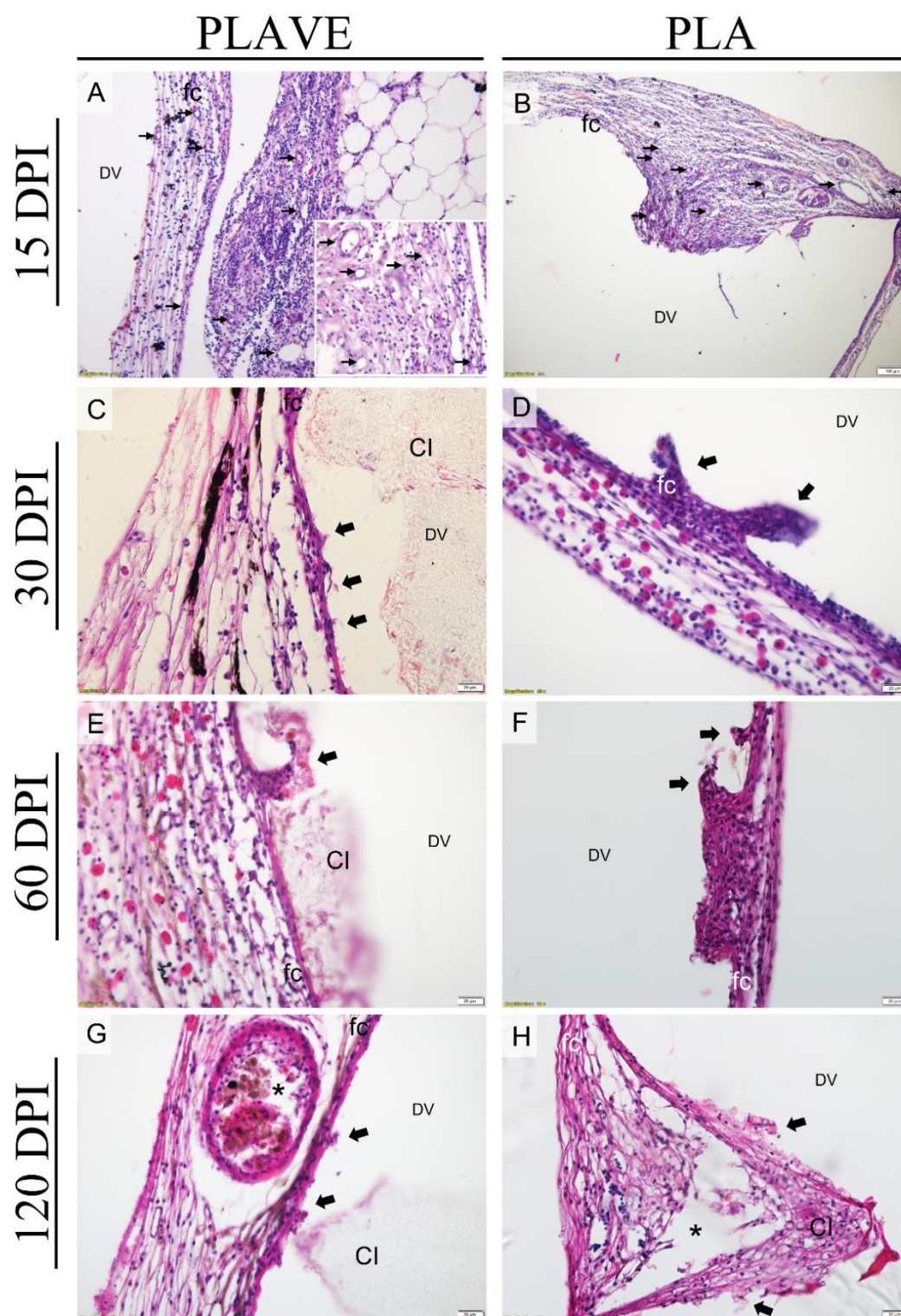


Figure 2. Photomicrographs of PLAVE and PLA intraperitoneal implants in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), stained with H&E. **(A - B)** diffuse mononuclear inflammatory infiltrate in the omentum adjacent to fibrotic capsule (fc), neovascularization in the capsule and omentum (thin arrows), and (DV) polymer location region (A; scale bar = 50µm; E; scale bar = 100µm) (A inset) neovascularization (thin arrows) in omentum

(bar = 20 μ m). **(C - D)** fibrotic capsule (fc) with macrophage paving and tissue projections on the polymer (thick black arrow), and in **(D)** presence of the eosinophilic granular cell in capsule. (CI) cell infiltration into the polymer and (DV) region of polymer location (scale bar = 20 μ m). **(E - F)** fibrotic capsule (fc) with macrophage paving and tissue projections with phagocyte cells into the polymer and surrounding the polymer (thick black arrow), and in **(E)** presence of the eosinophilic granular cell in capsule, (CI) cell infiltration within the polymer, and (DV) polymer location region (scale bar = 20 μ m). **(G - H)** fibrotic capsule (fc) with macrophage paving and tissue projections on the polymer, phagocyte cells surrounding the polymer (thick black arrow), and (*) phagocytosis points, (CI) cell infiltration into the polymer and (DV) region of polymer location (scale bar = 20 μ m).

The histochemistry and immunohistochemistry analysis presented mast cells (Fig 3A, B, C, D) and eosinophilic granular cells (Fig 3E, F, G, H) in abundance during 15, 30, and 60 DPI, with a decrease in these cells' presence in the fibrous capsule around the polymer from 120 DPI in subcutaneous implantation (Fig 4A). The count of these cells showed significant differences at both implantation sites throughout the experimental period, as PLA SC implantation resulted in a significant ($p < 0.05$) increase in cell counts when compared to PLA IP (15 DPI). However, at 120 DPI the eosinophilic granular cell (EGC) counts in the pure PLA and PLAVE implants both implanted through the IP route showed a significant increase ($p < 0.05$) in the count compared to the PLAVE SC implant. Furthermore, the evolution of the response over time revealed that EGC counts on PLAVE SC implants at 15 DPI were higher ($p < 0.05$) when compared to counts performed at 120 DPI (Fig. 4E).

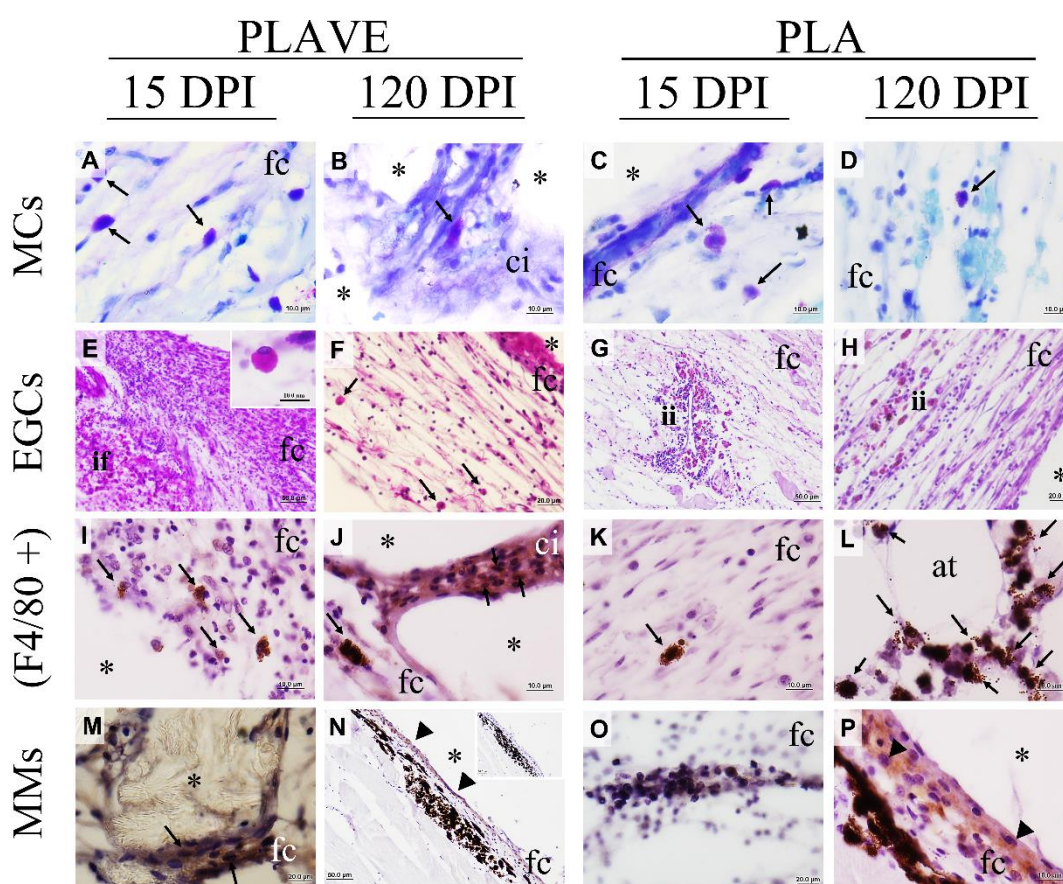


Figure 3: Photomicrographs of PLAVE and PLA intraperitoneal and subcutaneous implants in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **(A-D)** Mast cells (MCs) stained with Toluidine Blue (1% pH 4.0) in intraperitoneal implantation, **(A)** in fibrous capsule (fc) adjacent to polymer (black arrow; bar = 10μm), and in **(B)** cell growth (ci) within polymer (*) with mast cells (black arrow; scale bar = 10μm). **(C)** Mast cells observed in intraperitoneal fibrous capsule (fc) near polymer (*), and **(D)** mast cells observed in intraperitoneal fibrous capsule (fc) (black arrow; scale bar = 10μm). **(E-H)** Eosinophilic granular cells (EGCs) stained with Periodic Acid Schiff (PAS) in subcutaneous implant. **(E)** EGCs observed inflammatory focus (if) close to fibrous capsule (fc) (bar = 20μm); **(E inset)** eosinophilic granular cell (EGCs) (scale bar = 10μm). **(F)** EGCs (black arrow) observed in fibrous capsule (fc) close to polymer (*) (scale bar = 20μm). **(G)** inflammatory infiltrated (ii) with EGCs near to a blood vessel in fibrous capsule (fc), and **(H)** inflammatory infiltrated (ii) in fibrous capsule close to polymer (*) (scale bar = 20μm). **(I-L)** Phagocytes (F4/80 +) immunohistochemistry. **(I)** Phagocytes (black arrow) in fibrous capsule (fc) near polymer (*) in subcutaneous site (scale bar = 10μm), and **(J)** phagocytes (black arrow) in fibrous capsule (fc) and within cell growth within polymer (*) (scale bar = 10μm). **(K)** Fibrous capsule (fc) with phagocyte (black arrow) in intraperitoneal implantation (scale bar = 10μm), and **(L)** phagocytes (black arrow) observed in omentum adipose tissue (scale bar = 10μm). **(M-P)** Melanomacrophages phagocytes (MMs). **(M)** Fibrous capsule (fc) presenting melanomacrophages (black arrow) close to polymer (*) in subcutaneous site (scale bar = 10μm). **(N)**

Melanomacrophage phagocytes near to fibrous capsule (fc). Note the melanomacrophage inside fibrous capsule (arrowhead; scale bar = 20µm), and (**N inset**) negative control stained without primary antibody (F4/80), it is possible note that fibrous capsule is not stained (bar = 20µm). (**O**) Melanomacrophage in the fibrous capsule (fc) intraperitoneal implantation, and (**P**) melanomacrophage phagocytes near and inside fibrous capsule (fc) at the polymer (*) (O, and P; scale bar = 10µm).

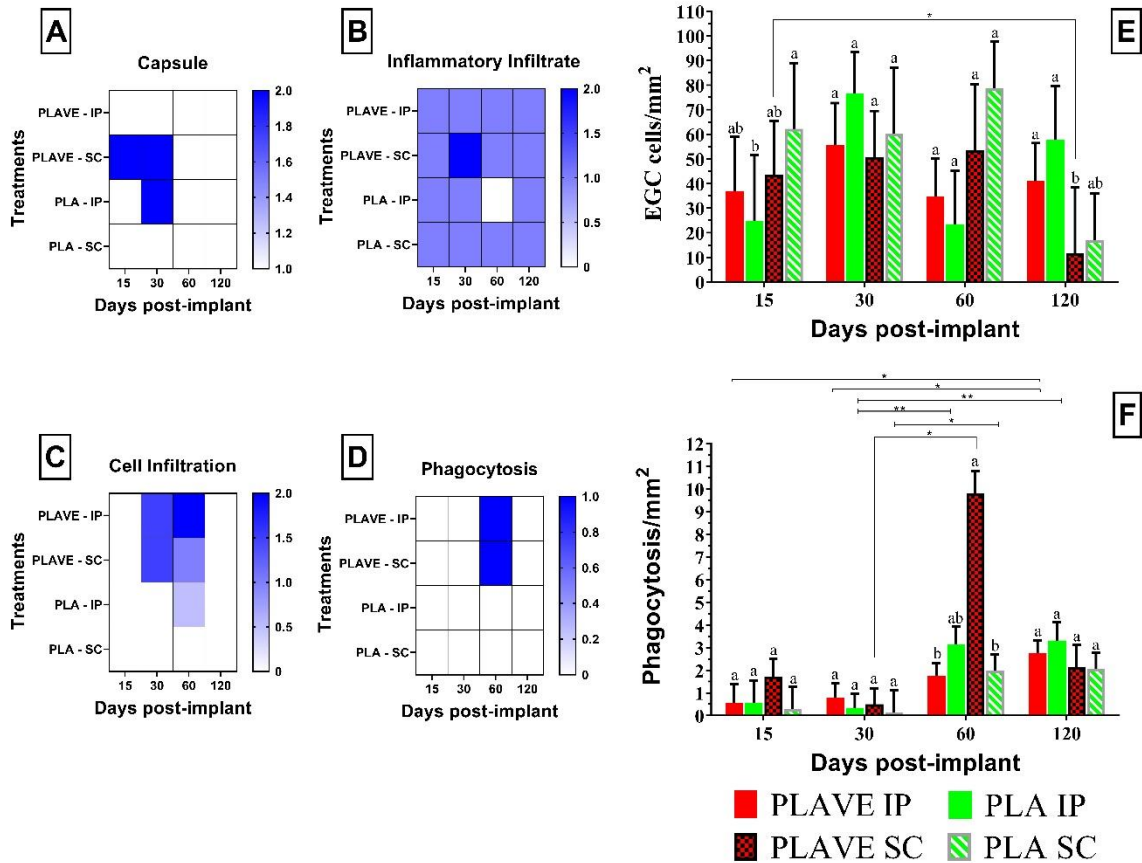


Figure 4. Heat map of tissue response scores of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The intensity of the color grade (color gradient) represents the magnitude of the score, and the more dark blue indicates a more massive tissue reaction (**A**, **B**, **C**, and **D**). The clustering tree at the days post-implantation (DPI) level was constructed at the bottom and tissue reactions were constructed at the left side, showing the relationship between time points (DPI) and histopathological analysis. The characteristic inflammatory tissue reaction to the implant was classified semi-quantitatively by scores (De Jong et al., 2005). 1- mild reaction; 2- moderate reaction; 3- intense reaction; 4- severe reaction. Hematoxylin-Eosin Staining. Means values ($\pm$ SE) and Kruskal-Wallis¹ test observed in the eosinophilic granular cells (**E**) and phagocytosis points counts (**F**) of tilapia post-implantation. Means ($n = 7$ fish/ treatment/ day sampling) followed by the same letter do not differ by the Dunn's test ($P < 0.05$). Lowercase letters compare treatments in each experimental period, while symbols (* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P \leq 0.001$). Sampling Period: 15, 30, 60, and 120 days post-implant (DPI); Two sites implantation: intraperitoneal (IP) and subcutaneous (SC); Treatments: PLA (polylactic acid), PLAVE (polylactic acid + vitamin E).

At 60 DPI it was observed in PLAVE SC implanted fish a significant ($p<0.05$) increase in phagocytosis points than other groups (PLA IP, PLAVE IP, and PLA SC) in the same period, and when compared at trial period 30 DPI (Fig 4F). PLA IP and SC implants show the same characteristic at 60 DPI when compared to other periods. At 120 DPI the fish receiving the PLAVE IP showed significantly higher ($p<0.05$) number of phagocytic foci than at 15, and 30 DPI. (Fig 4F). In phagocytic cells were observed biomaterial pieces inside vacuoles and pigmented aggregates in the cytoplasm. At 120 DPI, it was possible to detect F4/80+ phagocytes in tissue projections (Fig 3I, J, K, L), in addition to observing the accumulation of melanomacrophages in the pericapsular region (Fig 3M, N, O, P). In addition, small pieces and aggregates of the biodegrading polymer were observed in the fibrous capsule and adjacent tissue detached from the device surrounded by melanomacrophages, phagocytes, and mast cells (Fig 5A, B, C).

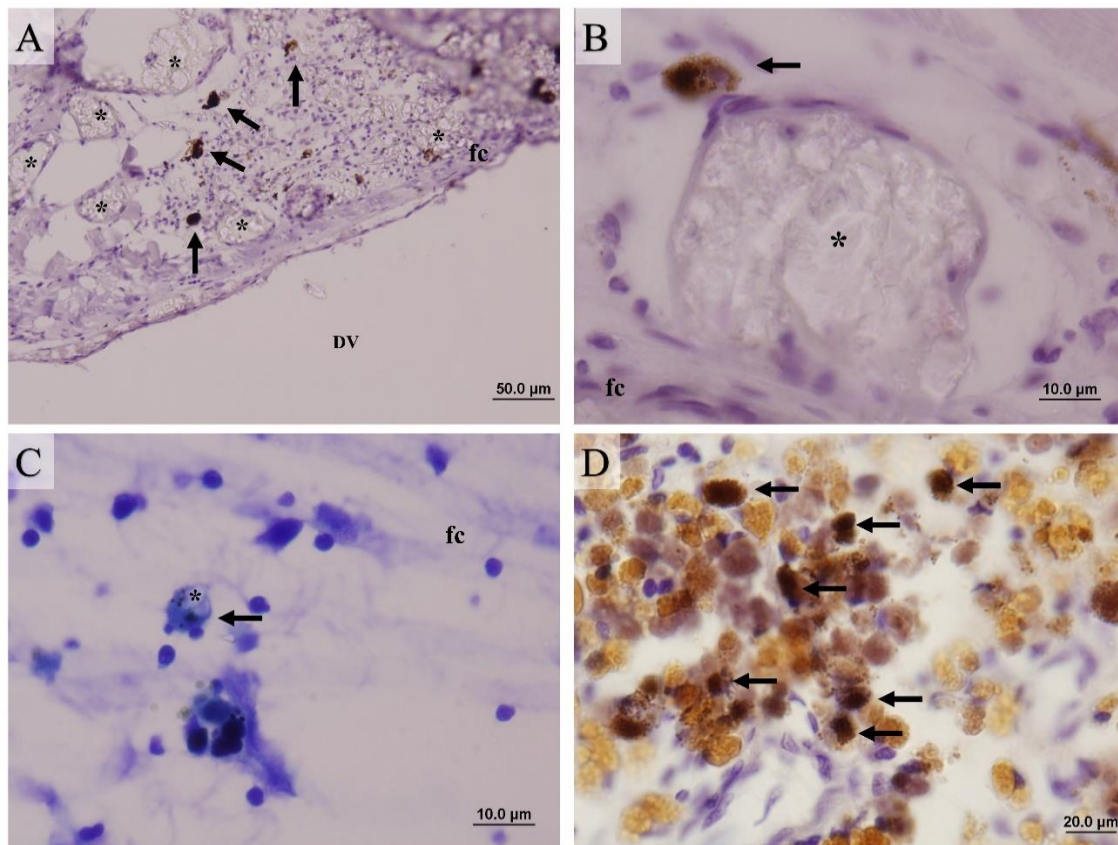


Figure 5. Photomicrographs of PLAVE and PLA intraperitoneal or subcutaneous implants in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **(A)** Phagocytosis sites (black arrow) stained with primary antibody (F4/80+) between fibrous capsule (fc) and polymer (DV) in subcutaneous at 60 DPI (bar = 50μm). **(B)** Phagocyte cell (black arrow) stained with primary antibody (F4/80+) around piece of polymer (*) in process to phagocytosis in

the fibrous capsule (fc) in subcutaneous at 60 DPI (bar = 10µm). **(C)** Piece of polymer inside phagocyte cell (black arrow) stained toluidine blue (1%, pH 4.0) in intraperitoneal at 120 DPI (bar = 10µm). **(D)** Phagocyte cells inside of melanomacrophage center in spleen (black arrows) stained with primary antibody (F4/80+) at 120 DPI (bar = 10µm).

Phagocytic cells (F4/80+) were observed into phagocytosis sites (Fig 5A), very near to biopolymers at 60 DPI (Fig 5B). These cells were observed also in spleen melanomacrophages (Fig 5D). Besides, piece of polymer was observed inside the phagocyte cells at 120 DPI (Fig 5C).

3.2 Spleen melanomacrophage centers (MMCs)

PLA and PLAVE implants did not result in significant changes ($p \geq 0.05$) in the percentage of occupation, number and area of MMCs in the tilapia's splenic tissues, during all the periods analyzed when compared to the non-implanted control fish (Table 1, Figure 6). However, PLAVE implanted tilapia presented significant increase ($p < 0.05$) in hemosiderin (15 DPI) and lipofuscin (120 DPI) pigments presented in spleen MMCs when compared to fish with PLA implants and control (Table 1). At 15 DPI, a significant increase in the amount of melanin was observed in MMCs of PLAVE tilapias compared to fish implanted with PLA, while fish implanted with PLA showed significant increase ($p < 0.05$) in melanin content (120 DPI) in relation to the amounts observed in the control animals (Table 1).

Table 1. Means¹ values observed in the histopathological study of spleen melanomacrophage centers of tilapia post-implantation.

Period ²	Treatment ²	Area ³	Number ³	% of occupation ³	Melanin (%)	Hemosiderin (%)	Lipofuscin (%)
15	PLAVE	8289.72 Aa	3.03 Aa	8.43 Aa	0.55 Aa	0.29 Aa	0.17 Ab
	PLA	4402.20 Aa	3.11 Aa	4.71 Aa	0.11 Bb	0.02 Bb	0.14 Aa
	Control	6551.73 Aa	4.20 Aa	7.00 Aa	0.26 ABa	0.01 Ba	0.19 Aa
30	PLAVE	8013.81 Aa	3.02 Aa	8.45 Aa	0.53 Aa	0.34 Aa	0.22 Aab
	PLA	7168.81 Aa	3.07 Aa	7.56 Aa	0.42 Aab	0.31 Aa	0.12 Aa
	Control	5567.34 Aa	2.87 Aa	5.67 Aa	0.24 Aa	0.31 Aa	0.08 Aa
60	PLAVE	7901.05 Aa	2.91 Aa	8.14 Aa	0.21 Aa	0.73 Aa	0.24 Aab
	PLA	8611.94 Aa	2.51 Aa	9.00 Aa	0.49 Aab	0.28 Aa	0.27 Aa
	Control	3281.91 Aa	3.60 Aa	3.33 Aa	0.34 Aa	0.17 Aa	0.10 Aa
120	PLAVE	4195.28 Aa	3.39 Aa	4.62 Aa	0.34 ABa	0.43 Aa	0.45 Aa
	PLA	3459.71 Aa	3.60 Aa	3.76 Aa	0.55 Aa	0.16 Aab	0.14 Ba
	Control	5502.49 Aa	3.36 Aa	5.83 Aa	0.15 Ba	0.18 Aa	0.12 Ba
Value of P ⁴		0.198	0.463	0.139	< 0.001	< 0.001	0.004

¹ Means (n = 35, 7 fish X 5 fields) followed by the same letter do not differ by the Dunn's test (P < 0.05). Capital letters in the columns compare treatments in each experimental period, while lowercase letters evaluate the evolution of each treatment among experimental periods.

² Sampling Period: 15, 30, 60, and 120 days post-implant (DPI); Treatments: PLA (polylactic acid), PLAVE (polylactic acid + vitamin E) and control (without implant).

³ Area of MMCs (μm^2); Number of MMCs counted by field; % of occupation of field area; Pigments present in the MMCs (Melanin, hemosiderin, and lipofuscin).

⁴ P value by Kruskal-Wallis test.

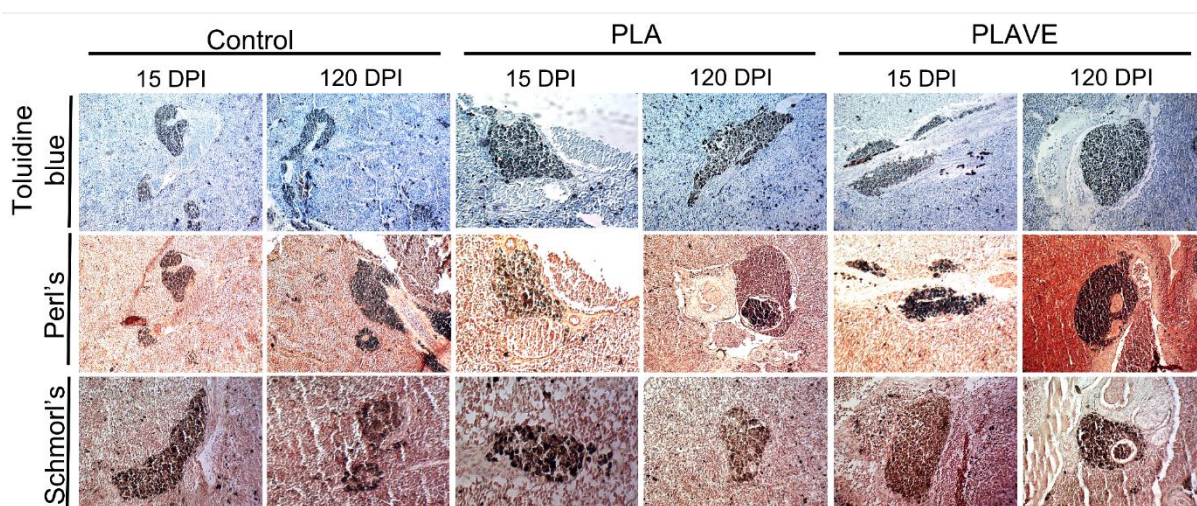


Figure 6. Photomicrographs stained by toluidine blue, Perl's, and Schmorl's of spleen melanomacrophages centers in Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*) at 15 and 120 DPI. Control (without implant), PLA (polylactic acid) and PLAVE (polylactic acid + vitamin E) (bar = 20 μ m).

3.3 Hematological analysis

The study of white blood cells revealed significant ($p < 0.05$) changes between implanted fish and controls (Fig. 7). However, it was observed a significant decrease ($p < 0.05$) in the number of leukocytes was observed, marked by the decrease in neutrophil and monocyte counts, which occurred gradually between the experimental days (15 to 120 DPI). Such results were accompanied by a significant increase ($p < 0.05$) in the number of thrombocytes (Figure 7). PLAVE implanted tilapia presented significant ($p < 0.05$) decrease in total leukocyte counts at 120 DPI while with the control fish and implanted with PLA, this decrease ($p < 0.05$) occurred at 60 DPI (Fig. 7). Tilapia implanted with PLA showed no significant ($p > 0.05$) decrease in monocyte counts when compared to fish with PLAVE implants and control fish (15 DPI). However, with the evolution of foreign body inflammatory reaction 60 DPI, tilapia implanted with PLAVE showed a significant ($p < 0.05$) increase in monocyte counts in relation to non-implanted control fish (Fig. 7). Non-implanted tilapia and implanted with PLAVE showed a significant decrease ($p < 0.05$) in the number of neutrophils at 120 DPI (Fig. 7).

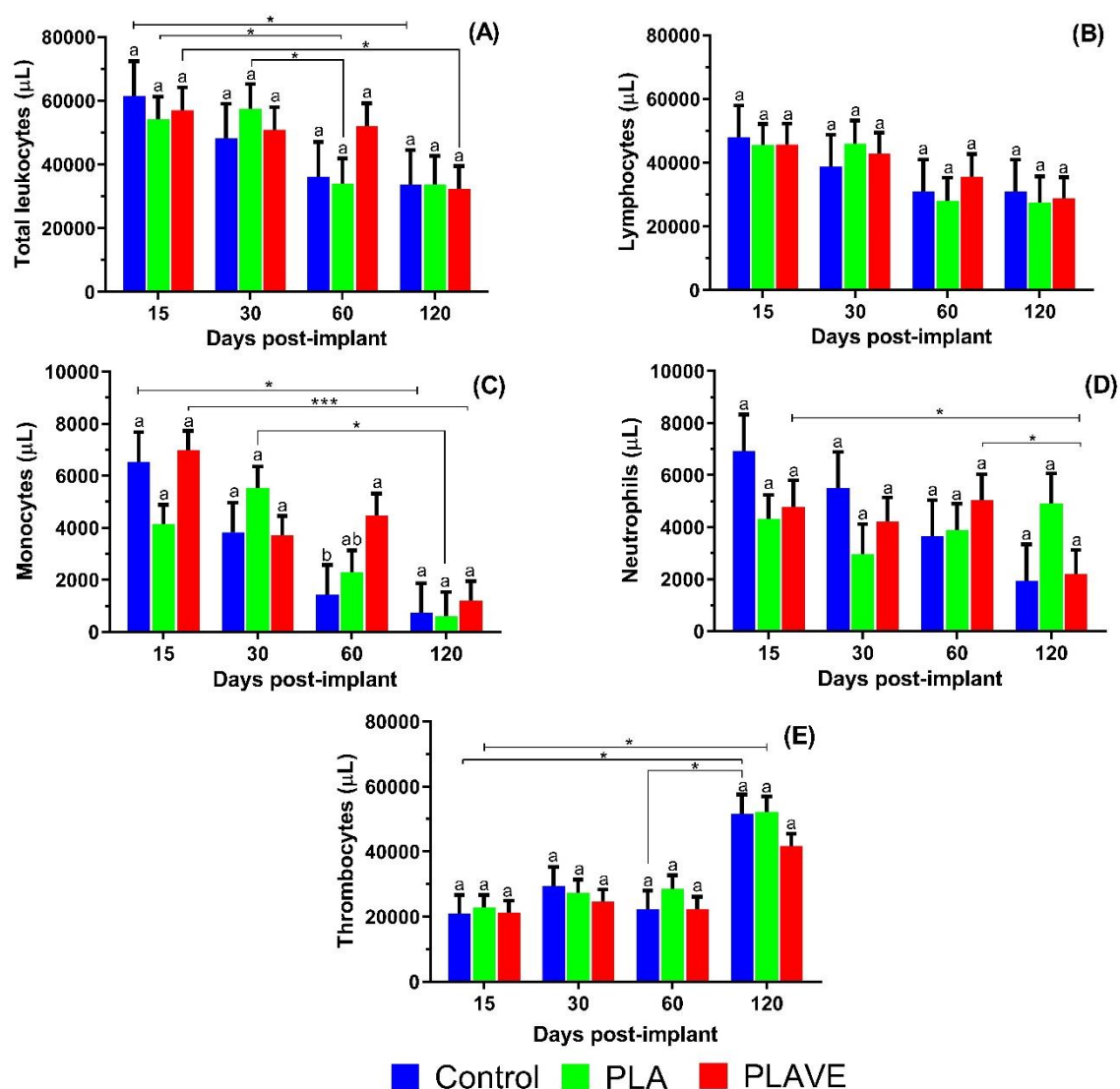


Figure 7: Means values ($\pm$ SE) and Kruskal-Wallis¹ observed in the white blood cell counts of tilapia post-implantation. Means ($n = 7$ fish/ treatment/ day sampling) followed by the same letter do not differ by the Dunn's test ($P < 0.05$). Lowercase letters compare treatments in each experimental period, while symbols (* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P \leq 0.001$). Sampling Period: 15, 30, 60, and 120 days post-implant (DPI); Treatments: PLA (polylactic acid), PLAVE (polylactic acid + vitamin E) and control (without implant).

The correlation analysis between the white blood cell counts and the respiratory burst showed 72.73% ($p = 0.0074$) of negative correlation between the number of circulating leukocytes and ROS production in control animals, as well as tilapia implanted with PLAVE, showed 52.66% ($p = 0.0040$) of positive correlation between thrombocyte counts and ROS production (Table 2).

Table 2. Correlation analysis between respiratory burst activity values and the absolute number of leukocytes and thrombocytes counts in the blood of tilapias post-implantation.

Correlated Parameters ¹	Experimental Sampling ²	Correlation analysis	
		ρ ³	Prob > $ \rho $ ³
Leukocytes X Burst	Control	-0.7273	0.0074
	PolA	-0.3258	0.1293
	PolAVE	-0.2729	0.1600
Thrombocytes X Burst	Control	0.2301	0.4705
	PolA	0.2284	0.2946
	PolAVE	0.5266	0.0040

¹ Leukocytes= absolute number of leukocytes and thrombocytes counts in the blood; Respiratory burst activity (NBT assays).

² Correlation among fish within each treatment. Control without implant (n=28), PLA (polylactic acid) (n=28), PLAVE (polylactic acid + vitamin E) (n=28).

³ ρ = Coefficient of Spearman Correlation; Prob.> $|\rho|$ – Significance Probability of ρ value.

The erythrogram study showed no significant difference between implanted fish and controls, except for an increase in hemoglobin concentrations in fish implanted with PLAVE 120 DPI (Table 3). In the evaluation between the experimental periods, there was observed a significant increase ($p < 0,05$) in erythrocyte counts and hemoglobin concentrations, such findings were accompanied by a significant decrease ($p < 0,05$) in mean corpuscular volume in fish implanted with PLA (120 DPI) (Table 3).

Table 3. Means¹ values observed in the blood analysis of tilapia post-implantation.

Period ²	Treatment ²	Erythrocytes (x10 ⁶ /mm ³)	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dL)	MCV ³ (fL)	MCH ³ (pg)	MCHC ³ (g/dL)
15	PLAVE	1.69 ^{Ab}	21.00 ^{Ab}	6.12 ^{Ab}	125.7 ^{Aa}	36.10 ^{Aa}	29.23 ^{Aab}
	PLA	1.67 ^{Aab}	23.57 ^{Aa}	6.04 ^{Aab}	140.0 ^{Aa}	36.00 ^{Aa}	25.90 ^{Aa}
	Control	1.46 ^{Aa}	23.33 ^{Aa}	5.20 ^{Aa}	159.8 ^{Aa}	35.61 ^{Aa}	22.62 ^{Aa}
30	PLAVE	1.87 ^{Aab}	22.86 ^{Ab}	6.80 ^{Aab}	113.5 ^{Aa}	36.35 ^{Aa}	32.89 ^{Aa}
	PLA	1.64 ^{Ab}	24.87 ^{Aa}	5.87 ^{Ab}	138.9 ^{Aab}	36.25 ^{Aa}	26.93 ^{Aa}
	Control	2.07 ^{Aa}	25.00 ^{Aa}	7.61 ^{Aa}	124.8 ^{Aa}	36.68 ^{Aa}	35.00 ^{Aa}
60	PLAVE	1.76 ^{Aab}	24.71 ^{Aab}	6.64 ^{Ab}	133.7 ^{Aa}	35.21 ^{ABa}	26.78 ^{Ab}
	PLA	1.82 ^{Aab}	24.00 ^{Aa}	6.28 ^{Aab}	133.5 ^{Aab}	33.88 ^{Bb}	24.49 ^{Aa}
	Control	1.86 ^{Aa}	29.67 ^{Aa}	7.77 ^{Aa}	161.0 ^{Aa}	42.07 ^{Aa}	26.22 ^{Aa}
120	PLAVE	2.55 ^{Aa}	32.14 ^{Aa}	9.44 ^{Aa}	111.0 ^{Aa}	35.63 ^{Aa}	28.44 ^{Aab}
	PLA	2.83 ^{Aa}	27.08 ^{Aa}	8.46 ^{ABa}	100.9 ^{Ab}	31.84 ^{Aab}	30.75 ^{Aa}
	Control	2.29 ^{Aa}	23.33 ^{Aa}	7.16 ^{Ba}	102.8 ^{Aa}	32.21 ^{Aa}	31.25 ^{Aa}
Value of P ⁴		0.007	0.003	< 0.001	0.002	0.027	0.016

¹ Means (n = 7 fish) followed by the same letter do not differ by the Dunn's-test (P < 0.05). Capital letters in the columns compare treatments in each experimental period, while lowercase letters evaluate the evolution of each treatment among experimental periods.

² Sampling Period: 15, 30, 60, and 120 days post-implant (DPI); Treatments: PLA (polylactic acid), PLAVE (polylactic acid + vitamin E) and control (without implant).

³ MCV-Mean corpuscular volume; MCH-Mean corpuscular hemoglobin; MCHC-Mean corpuscular hemoglobin.

⁴ P value by Kruskal-Wallis test.

3.4 Serum biochemical analyzes

In the serum biochemical study (Figure 8), the enzymatic activity did not show significant changes ($p \geq 0.05$) among treatments. Implanted fish with PLAVE showed a significant increase ($p < 0.05$) in ALT (30 DPI) and total protein (120 DPI) during the foreign body reaction (Fig 8A; 8D). In fish implanted with PLA significant increase ($p < 0.05$) in ALT (120 DPI) and ALP (60 DPI) were observed (Fig 8A; 8C). Control fish (non-implanted) showed increase ($p < 0.05$) in total protein levels at 60 DPI (Fig 8D).

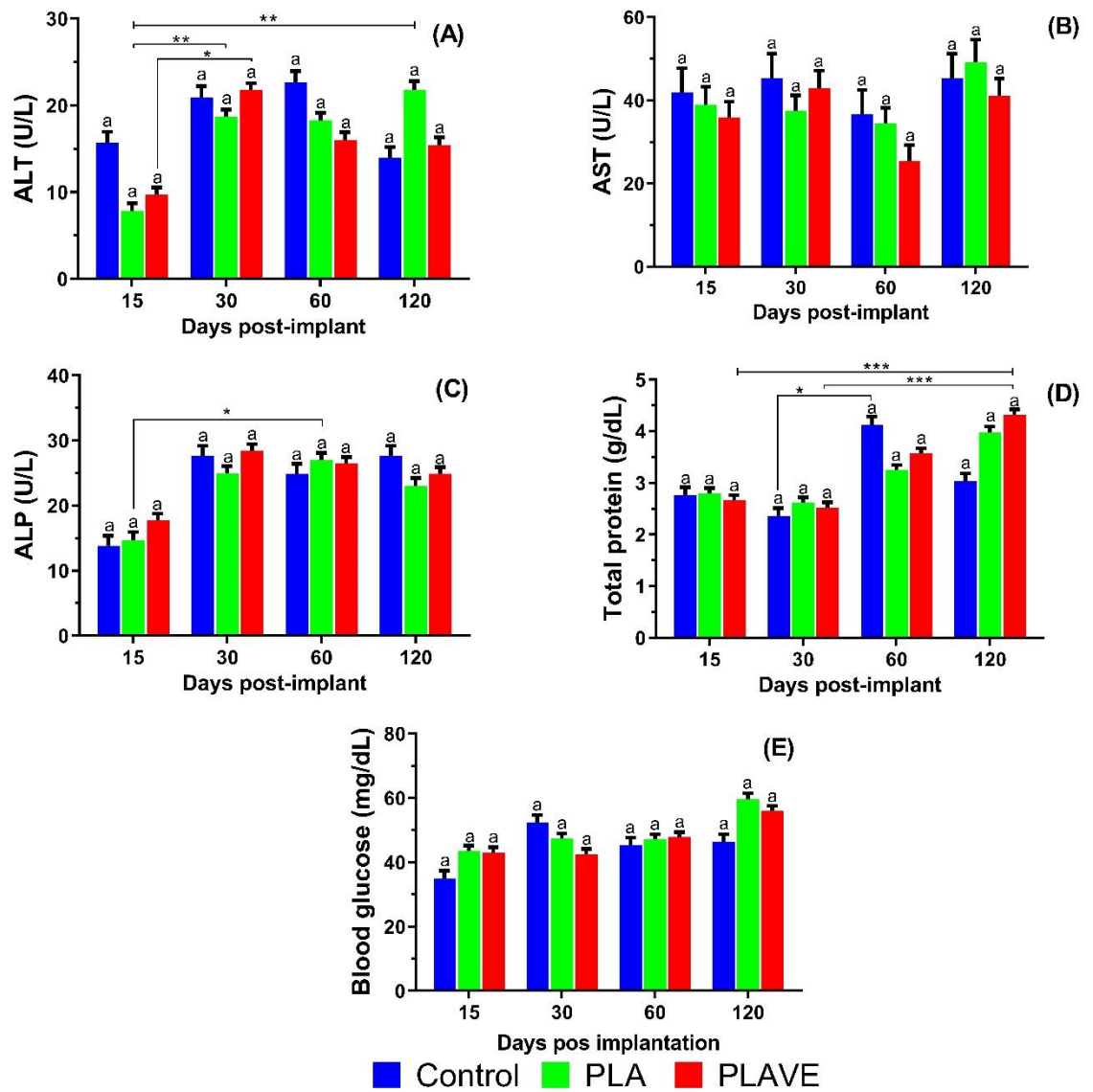


Figure 8: Means values ($\pm$ SE) and Kruskal-Wallis¹ observed in serum biochemical analyzes of ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), ALP (alkaline phosphatase), total protein, and blood glucose of tilapia post-implantation. Means ($n = 7$ fish/ treatment/ day sampling) followed by the same letter do not differ by the Dunn's test ($P < 0.05$). Lowercase letters compare treatments in each experimental period, while symbols (* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P \leq 0.001$) evaluate the evolution of each treatment among experimental periods. Sampling Period: 15, 30, 60, and 120 days post-implant (DPI); Treatments: PLA (polylactic acid), PLAVE (polylactic acid + vitamin E) and control (without implant).

4. Discussion

This study was a pioneer in evaluating the biocompatibility (clinical safety) and biodegradability of poly (lactic acid) (PLA) devices with or without vitamin E implanted subcutaneously and intraperitoneally in Nile tilapia. Since the histopathological study of polymer degradation provides important knowledges in the foreign body reaction evaluation. The determination of hematological and biochemical parameters in the clinical routine is essential, as they provide important information about the prognosis of morbid conditions [31] and allows us to assess whether the device implantation was capable of producing harmful effects to fish.

The interaction of the biomaterial's surface with the tissues triggers the onset of the inflammatory response, and tissue repair culminates in completion of this process [7]. Infiltration of mononuclear inflammatory cells and neovascularization were observed in the subcutaneous tissues and omentum of tilapia at 15 DPI. Fish implanted with polymer containing vitamin E showed more intense cellular responses and earlier capsular formation, mainly in implants present in the subcutaneous tissue, corroborating the findings of Belo et al. [24] who observed a significant increase in the accumulation of macrophages and giant cell formation in glass coverslips implanted in the subcutaneous tissue of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, when supplemented with vitamin E.

The presence of eosinophilic granular cells (EGCs) in both sites of implantation (IP and SC) is related to persistent inflammatory reactions, and this response has been reported as a characteristic for the development of fibrous tissue in bony fish [37]. For Matsuyama and Iida [38], the EGC degranulation is associated with the migration of neutrophils to inflammation sites in Nile tilapia. In addition, tilapia belongs to the order of perciforms, an evolutionarily advanced class in which Mast cells / EGCs produce histamine, an important chemotactic agent for macrophages [39].

According to Mayer et al. [40], macrophages play a pivotal role in the foreign body reaction by favoring the pro-inflammatory microenvironment around the device, modulating pro-fibrotic growth factors such as TGF- β . Macrophages present in the inflamed focus are derived from circulating monocytes, and their accumulation in the device depends on the renewal rate [41]. Tilapia implanted with PLAVE showed an

increase in the number of circulating monocytes at 60 DPI, suggesting the hypothesis of vitamin E participation in the kinetics of these cells between blood compartment and inflamed site.

The acute inflammatory response is triggered by mast cell degranulation, increasing vascular permeability attracting monocytes, macrophages and neutrophils inducing the release of ROS [42]. The acute inflammatory response quickly evolves to a chronic response composed of mononuclear cells in less than fifteen days [11]. An adverse effect induced by implantation of biomaterial is the exhaustion and depletion of oxidative resources of granulocytes and neutrophils, due to continuous release [13;43].

Fibroblasts and thrombocytes also participate in synthesis of granulation tissue synthesis which will support the capsule formation. Tilapia implanted with PLAVE showed a correlation between the increase in reactive oxygen species (ROS) production and the increase in the number of thrombocytes, suggesting the activation of these cells by this tocopherol and their effective participation in the immune mechanism of tilapia during chronic inflammation. However, little is known about the role of these cells in the pathophysiology of the foreign body inflammatory reaction. Thrombocytes express MHCI and MHCII, being able to process intracellular antigens and present them to effector cells, in addition to producing immunoregulatory cytokines and chemokines such as interleukin 1 β [44;45;46]. High counts of thrombocytes have been described in the exudate during acute phase inflammation by different kinds of stimuli [47;48;49;50;51].

In the later stage of the tilapia's inflammatory reaction, there was an increase in cellular infiltration internally to the polymer and the occurrence of phagocytosis, these events were potentiated by the use of vitamin E. According to Anderson et al. [11] and Franz et al. [13], macrophages activated on the biomaterial surface express IL-1 β which is chemoattractive to leukocytes in fish, stimulating the migration and accumulation of inflammatory cells, in addition to favoring phagocytic activity [52]. The increase in monocyte and neutrophil counts in SC-PLAVE-implanted tilapia (60 DPI) occurred concomitantly with the increase in cellular infiltration and phagocytosis in the polymer, highlighting the importance of this tocopherol in the activation of inflammatory cells. Dawood et al. [26] fed Nile tilapia with supplemented diets containing vitamin E

nanoparticles for 8 weeks, resulting in increased gene expression for IL-1 β in splenic and liver cells, and improvements in phagocytic indices. On the other hand, non-implanted tilapia showed a negative correlation in ROS production and leukocyte counts, confirming the hypothesis that in fish without inflammatory stimulus their blood leukocytes were not activated.

The decrease in neovascularization observed after 30 DPI is related to the resolution phase of the healing process [53;54]. However, the presence of giant foreign body type cells increased in the inflamed focus 60 and 120 DPI. However, the presence of phagocytic cells (F4/80+) was observed in the inflamed sites in both implantations (IP and SC). The role of these cells in the evolution of the chronic inflammatory reaction is not completely understood. These giant cells participate in the release of pro-inflammatory agents, which favor the recruitment, accumulation, and activation of new macrophages, which act in the degradation and absorption of biomaterials [9;29;34;54]. Phagocytic cells (F4 / 80 +) have been reported in medaka fish used as a model for inflammation and oxidative stress, describing that positive cells are activated macrophages [55]. During this experiment, we did not observe the complete device biodegradation, possibly due to the short analysis period (120 days), since the time required for PLA biodegradation is estimated to be about 2 years [56].

The release of cytotoxic components damages the surrounding tissue, prolonging the inflammatory response [13]. Serious damage to tissues, infections, and foreign materials that constantly signal the activation of macrophages and stimulate the formation of melanomacrophage centers (MMCs) [57]. Interestingly, macrophages present in the tilapia's splenic melanomacrophage centers were reactive to the antibody (F4/80+). Manrique et al. [58] studied the kinetics of splenic MMCs formation in tilapia after BCG stimulation or glass coverslips implantation in the subcutaneous tissue. For these authors, the formation of MMCs in tilapia is directly related to the type of inflammatory stimulus. The application of BCG caused a significant increase in area and number of MMCs when compared to the foreign body type response. Our results of polymer implantation in tilapia corroborate the findings of these authors since there were no significant variations in the number and size of splenic MMCs during the foreign body reaction when compared to the non-implanted control fish. It has been discussed the hypothesis that MMCs are sites of humoral adaptive immune response

in teleost fish, having many structural, cellular, and molecular similarities with the germinal centers in mammals [59].

There were changes in the composition of MMCs, and tilapia implanted with polymer containing vitamin E showed an increase in the amount of melanin in the initial phase at 15 DPI, while in fish implanted with pure PLA this response was late with 120 DPI, suggesting the beneficial participation of this tocopherol in the defense responses of tilapia. Classified as complex polymers, the melanin absorbs and neutralizes toxicants, cations, and free radicals, released in the catabolism of fatty acids derived from cell membrane phagocytosis [60].

Hemosiderin increase in PLAVE-implanted fish in the initial phase (15 DPI) could be associated with a better immune response, since the accumulation of this compound may be associated with the catabolism of damaged red cells and as a protective mechanism in the spleen [57]. This characteristic was observed by Manrique et al. [36] after inoculation of Nile tilapia with *Aeromonas hydrophila*, which causes hemorrhagic septicemia. Lipofuscin is normally observed in close association with hemosiderin granules [61], which explains its high percentage of this pigment in spleen MMCs at 120 DPI in fish implanted with PLAVE. This pigment is the result of oxidative processes and polymerization of polyunsaturated fatty acids [62], and it is associated with the uptake of red blood cells and leukocytes, effective or apoptotic [63], processes considered normal in healthy animals.

The results of blood analysis, in conjunction with histopathological studies, allow us to evaluate the safety of PLA devices for use in Nile tilapia. PLA implants resulted in decreased MCV (120 DPI) possibly due to electrolyte changes by the stress stimulus that represented the foreign body inflammatory reaction, and these findings were more significant in PLAVE implanted fish, corroborating the findings of Belo et al. [25] who verified microcytosis in vitamin E-supplemented pacus after glass coverslips implantation in the subcutaneous tissue. Vitamin E conjugated to PLA as a slow-release vehicle increased the percentage of hematocrit and hemoglobin concentration (120 DPI), confirming the results of hemosiderin present in splenic MMCs, possibly associated with a modulation of splenic hematopoietic activity. Nile tilapia supplemented with vitamin E for 10 weeks showed similar results with increased hematocrit values [64]. Despite these hematological variations observed in implanted

fish, they are within the physiological limits for tilapia described by other authors [65;66].

The serum biochemical study of tilapia did not reveal changes in cytotoxicity and liver function in implanted fish, with no differences when compared to controls, except for the serum values of total protein (120 DPI). Initial decrease in ALT enzyme activity and increase in total protein, blood glucose, and alkaline phosphatase were observed throughout the study. These findings were more significant in PLAVE-implanted tilapia. Qiang et al. [27] reported that vitamin E increased the amount of total protein and decreased serum ALT activity, as noted in our study. The absence of side effects in hematological and biochemical findings, including the absence of mortality after device implantation, proves its clinical safety in Nile tilapia in the period studied.

In this context, the biocompatibility and biodegradation of polymers depend on factors intrinsic to the material itself, such as: shape, size, chemical composition, sterility, duration of contact, and degradation, in addition to external factors related to the host species and the implantation site of the device [12;67]. Therefore, the biocompatibility and biodegradation study of PLA implants in tilapia has demonstrated clinical safety and excellent evolution of foreign body inflammatory responses during the period test (i.e 120 DPI), and these findings were significantly enhanced using vitamin E in the polymer. Our findings are promising, considering the tilapia rearing period which is eight months and the absence of mortality at 120 DPI, that is, half of the rearing period leads us to believe that the material presented here can serve as a basis for future research that seeks to study drugs or vaccines with the objective of slow and continuous release.

5. References

- [1] McGovern, J.A., Griffin, M., Hutmacher, D.W., 2018. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Disease models & mechanisms*, 11, dmm033084. <https://doi.org/10.1242/dmm.033084>
- [2] Buscemi, S., Palumbo, V.D., Maffongelli, A., Fazzotta, S., Palumbo, F.S., Licciardi, M., Buscemi, G., 2017. Electrospun PHEA-PLA/PCL Scaffold for Vascular Regeneration: A Preliminary in Vivo Evaluation. In *Transplantation proceedings*. 49,716-721. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2017.02.017>

- [3] Blackstone, B.N., Hahn, J.M., McFarland, K.L., DeBruler, D.M., Supp, D.M., Powell, H.M., 2018. Inflammatory response and biomechanical properties of coaxial scaffolds for engineered skin in vitro and post-grafting. *Acta biomaterialia*. 80, 247-257. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.014>
- [4] Pavot, V., Berthet, M., Rességuier, J., Legaz, S., Handké, N., Gilbert, S.C., Verrier, B., 2014. Poly (lactic acid) and poly (lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. *Nanomedicine*. 9, 2703-2718. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.156>
- [5] Haroosh, H.J., Dong, Y., Lau, K.T., 2014. Tetracycline hydrochloride (TCH)-loaded drug carrier based on PLA: PCL nanofibre mats: experimental characterisation and release kinetics modelling. *Journal of materials science*. 49, 6270-6281. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8352-7>
- [6] Sacchetin, P.S.C., Setti, R.F., e Rosa, P.D.T.V., Moraes, Â.M., 2016. Properties of PLA/PCL particles as vehicles for oral delivery of the androgen hormone 17 α -methyltestosterone. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 870-881. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.071>
- [7] Williams, D.F., 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29, 2941-2953. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>
- [8] Saini, P., Arora, M., Kumar, M.R., 2016. Poly (lactic acid) blends in biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 47-59. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.014>
- [9] Pogorielov, M., Hapchenko, A., Deineka, V., Rogulska, L., Oleshko, O., Vodseďáľková, K., Erben, J., 2018. In vitro degradation and in vivo toxicity of NanoMatrix3D® polycaprolactone and poly (lactic acid) nanofibrous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 106,2200–2212. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36427>
- [10] Onuma, Y., Serruys, P. W. 2011. Bioresorbable scaffold: the advent of a new era in percutaneous coronary and peripheral revascularization?. *Circulation*, 123, 779-797. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.971606>
- [11] Anderson, J.M., Rodriguez, A., Chang, D.T., 2008. Foreign body reaction to biomaterials. In *Seminars in immunology* (Vol. 20, No. 2, pp. 86-100). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004>

- [12] Ramot, Y., Haim-Zada, M., Domb, A.J., Nyska, A., 2016. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.012>
- [13] Franz, S., Rammelt, S., Scharnweber, D., Simon, J.C., 2011. Immune responses to implants—a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*. 32, 6692-6709. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.078>
- [14] Fernandes, D.C., Eto, S.F., Funnlicelli, M.I., Fernandes, C.C., Charlie-Silva, I., Belo, M.A., Pizauro, J.M., 2019. Immunoglobulin Y in the diagnosis of *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 500, 576-585. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.045>
- [15] Delphino, M.K., Barone, R.S., Leal, C.A., Figueiredo, H.C., Gardner, I.A., Gonçalves, V.S., 2019a. Economic appraisal of vaccination against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia farms in Brazil. *Preventive veterinary medicine*. 162, 131-135. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.12.003>
- [16] Delphino, M.K., Leal, C.A., Gardner, I.A., Assis, G.B., Roriz, G.D., Ferreira, F., Gonçalves, V.S., 2019b. Seasonal dynamics of bacterial pathogens of Nile tilapia farmed in a Brazilian reservoir. *Aquaculture*. 498, 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.023>
- [17] Raghuvanshi, R. S., Katare, Y. K., Lalwani, K., Ali, M. M., Singh, O., Panda, A. K. 2002. Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *International journal of pharmaceutics*, 245, 109-121. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00342-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00342-3)
- [18] Behera, T., Nanda, P. K., Mohanty, C., Mohapatra, D., Swain, P., Das, B. K., ... & Sahoo, S. K. 2010. 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 immunology*, 28, 320-325. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.009>
- [19] Feng, S. S., Mu, L., Chen, B. H., Pack, D. 2002. Polymeric nanospheres fabricated with natural emulsifiers for clinical administration of an anticancer drug paclitaxel (Taxol®). *Materials Science and Engineering: C*, 20, 85-92. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00017-6)

- [20] Mu, L., Feng, S.S., 2002. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol®). *Journal of Controlled Release*. 80, 129-144. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00025-1)
- [21] Schubert, M. A., Wiggins, M. J., DeFife, K. M., Hiltner, A., Anderson, J. M. 1996. Vitamin E as an antioxidant for poly (etherurethane urea): in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 32, 493-504. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199612\)32:4%3C493::AID-JBM1%3E3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199612)32:4%3C493::AID-JBM1%3E3.0.CO;2-M)
- [22] McNally, A. K., Anderson, J. M. (2003). Foreign body-type multinucleated giant cell formation is potently induced by α -tocopherol and prevented by the diacylglycerol kinase inhibitor R59022. *The American journal of pathology*, 163, 1147-1156. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63474-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63474-8)
- [23] Huang, C. H., Chang, R. J., Huang, S. L., Chen, W. 2003. Dietary vitamin E supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 134, 265-270. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00256-7](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00256-7)
- [24] Belo, M.A.D.A., Schalch, S.H.C., Moraes, F.R., Soares, V.E., Otoboni, A.M.M.B., Moraes, J.E.R., 2005. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of Comparative Pathology*. 133, 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.04.004>
- [25] Belo, M.A.A., de Moraes, F.R., Yoshida, L., da Rosa Prado, E.J., de Moraes, J.R.E., Soares, V.E., da Silva, M.G., 2014. Deleterious effects of low level of vitamin E and high stocking density on the hematology response of pacus, during chronic inflammatory reaction. *Aquaculture*. 422, 124-128. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.013>
- [26] Dawood, M.A., Zommara, M., Eweedah, N.M., Helal, A.I., 2019. Synergistic effects of selenium nanoparticles and vitamin E on growth, immune-related gene expression, and regulation of antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biological Trace Element Research*. 1-12. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01857-6>

- [27] Qiang, J., Wasipe, A., He, J., Tao, Y.F., Xu, P., Bao, J.W., Zhu, J.H., 2019. Dietary vitamin E deficiency inhibits fat metabolism, antioxidant capacity, and immune regulation of inflammatory response in genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) fingerlings following *Streptococcus iniae* infection. *Fish & shellfish immunology*, 92, 395-404. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.026>
- [28] Boyd, Claude E., 1990. *Water Quality in Ponds for Aquaculture*, Alabama Agricultural Experiment 416 Station, Auburn University, AL, USA.
- [29] Ciambelli, G.S., Perez, M.O., Siqueira, G.V., Candella, M.A., Motta, A.C., Duarte, M.A.T., Duek, E.A.D.R., 2013. Characterization of poly (L-co-D, L Lactic Acid) and a study of polymer-tissue interaction in subcutaneous implants in wistar rats. *Materials Research*. 16, 28-37. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392012005000146>
- [30] Miszuk, J. M., Xu, T., Yao, Q., Fang, F., Childs, J.D., Hong, Z., Sun, H., 2018. Functionalization of PCL-3D electrospun nanofibrous scaffolds for improved BMP2-induced bone formation. *Applied materials today*. 10, 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.12.004>
- [31] Belo, M.A.A., Souza, D.G.F., Faria, V.P., Prado, E.J.R., Moraes, F.R., Onaka, E.M., 2013. Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. *Journal of fish biology*. 82, 1403-1410. <https://doi.org/10.1111/jfb.12060>
- [32] Farias, T.H.V., Levy-Pereira, N., de Oliveira Alves, L., de Carla Dias, D., Tachibana, L., Pilarski, F., Ranzani-Paiva, M.J.T., 2016. Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. *Animal Feed Science and Technology*. 211, 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.11.004>
- [33] Belo, M.A.A., Soares, V.E., de Souza, L.M., da Rosa Sobreira, M.F., Cassol, D.M.S., Toma, S.B., 2012. Hepatoprotective treatment attenuates oxidative damages induced by carbon tetrachloride in rats. *Experimental and toxicologic pathology*. 64, 155-165. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.08.001>
- [34] De Jong, W.H., Bergsma, J.E., Robinson, J.E., Bos, R.R., 2005. Tissue response to partially in vitro predegraded poly-L-lactide implants. *Biomaterials*. 26, 1781-1791. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.026>

- [35] Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 9, 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- [36] Manrique, W.G., Figueiredo, M.A.P., Charlie-Silva, I., de Andrade Belo, M.A., Dib, C.C., 2019. Spleen melanomacrophage centers response of Nile tilapia during *Aeromonas hydrophila* and *Mycobacterium marinum* infections. *Fish & Shellfish Immunology*. 95, 514-518. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.10.071>
- [37] Reite, O. B., Evensen, Ø. 2006. Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish & shellfish immunology*, 20, 192-208. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.012>
- [38] Matsuyama, T., Iida, T. 1999. Degranulation of eosinophilic granular cells with possible involvement in neutrophil migration to site of inflammation in tilapia. *Developmental & Comparative Immunology*, 23, 451-457. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00027-0)
- [39] Mulero, I., Sepulcre, M. P., Meseguer, J., García-Ayala, A., Mulero, V. 2007. Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 19434-19439. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704535104>
- [40] Mayer, A., Roch, T., Kratz, K., Lendlein, A., Jung, F., 2012. Pro-angiogenic CD14++ CD16+ CD163+ monocytes accelerate the in vitro endothelialization of soft hydrophobic poly (n-butyl acrylate) networks. *Acta Biomaterialia*. 8, 4253-4259. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.011>
- [41] Sakabe, R., Moraes, F.R.D., Belo, M.A.D.A., Pilarski, F., Moraes, J.R.E.D., 2013. Kinetics of chronic inflammation in Nile tilapia fed n-3 and n-6 essential fatty acids. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 48, 313-319. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000300010>
- [42] Sarma, J. V., Ward, P. A. 2011. The complement system. *Cell and tissue research*, 343, 227-235. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>
- [43] Patel, J. D., Krupka, T., Anderson, J. M. 2007. iNOS-mediated generation of reactive oxygen and nitrogen species by biomaterial-adherent neutrophils. *Journal of biomedical materials research Part A*, 80, 381-390. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30907>

- [44] Köllner, B., Fischer, U., Rombout, J.H.W.M., Taverne-Thiele, J.J., Hansen, J.D., 2004. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. *Developmental & Comparative Immunology*. 28, 1049-1062. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.03.005>
- [45] Jaros, J., Korytar, T., Huong, D.T., Weiss, M., Köllner, B., 2013. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) thrombocytes are involved in MHC II dependent antigen presentation. *Fish and Shellfish Immunology*. 6, 1657. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.072>
- [46] Obirikorang, K.A., Agbo, N.W., Obirikorang, C., Adjei-Boateng, D., Ahiave, S.E., Skov, P.V., 2019. Effects of water flow rates on growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture international*. 27, 449-462. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00342-0>
- [47] Reque, V.R., de Moraes, J.R.E., de Andrade Belo, M.A., de Moraes, F.R., 2010. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Aquaculture*, 300, 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.014>
- [48] Claudiano, G.S., Petrillo, T.R., Manrique, W.G., Castro, M.P., Loureiro, B.A., Marcusso, P.F., De Moraes, F.R., 2013. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. *Fish & shellfish immunology*. 34, 1057-1062. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.006>
- [49] Castro, M.P., Claudiano, G.S., Bortoluzzi, N.L., Garrido, E., Fujimoto, R.Y., Belo, M.A.A., Moraes, F.R., 2014. Chromium carbochelate dietary supplementation favored the glucocorticoid response during acute inflammation of *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*. 432, 114-118. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.036>
- [50] Moraes, A.C., Prado, E.J., Foz, E.P., Barbuio, R., Faria, V.P., Belo, M.A., 2018. Hepatic steatosis alters cellular recruitment during induced aerocystitis in Nile tilapia. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 1570-1576. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5533>
- [51] Prado, E.J.R., Belo, M.A.A., Moraes, A.C., Barbuio, R., Foz, E.P., Faria, V.P., Sebastião, F.A., 2018. Insulin favors acute inflammatory reaction in alloxan-diabetic tilapia during infectious aerocystitis. *Pesq. Vet. Bras.* 38, 2190-2193. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5532>

- [52] Zou, J., Secombes, C.J., 2016. The function of fish cytokines. *Biology*. 5, 23. <https://doi.org/10.3390/biology5020023>
- [53] Padera, R.F., Colton, C.K., 1996. Time course of membrane microarchitecture-driven neovascularization. *Biomaterials*. 17, 277-284. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85565-7](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85565-7)
- [54] Klopffleisch, R., Jung, F., 2017. The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 105, 927-940. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35958>
- [55] Nagoya, T., Kamimura, K., Goto, R., Shinagawa-Kobayashi, Y., Niwa, Y., Kimura, A., Terai, S. 2019. Inhibition of sodium-glucose cotransporter 2 ameliorates renal injury in a novel medaka model of nonalcoholic steatohepatitis-related kidney disease. *FEBS open bio*, 9(12), 2016-2024. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12734>
- [56] Nair, L.S., Laurencin, C.T., 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science*. 32, 762-798. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>
- [57] Agius, C., Roberts, R.J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of fish diseases*. 26, 499-509. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>
- [58] Manrique, W.G., da Silva Claudiano, G., Petrillo, T.R., De Castro, M.P., Pereira Figueiredo, M. A., de Andrade Belo, M.A., De Moraes, F.R., 2014. Response of splenic melanomacrophage centers of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) to inflammatory stimuli by BCG and foreign bodies. *Journal of Applied Ichthyology*. 30, 1001-1006. <https://doi.org/10.1111/jai.12445>
- [59] Steinel, N.C., Bolnick, D.I., 2017. Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in immunology*. 8, 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00827>
- [60] Zuasti, A., Jara, J.R., Ferrer, C., Solano, F., 1989. Occurrence of melanin granules and melanogenesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pigment Cell Research*. 2, 93-99. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1989.tb00168.x>

- [61] Agius, C., Agbede, A.S., 1984. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *Journal of fish biology*. 24, 471-488. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04818.x>
- [62] Pickford, G.E., 1953. A study of the hypophysectomized male killifish, *Fundulus heteroclitus* (Linn.). *Bull. Bingham Oceanogra. Coll.* 14, 5-41.
- [63] Wolke, R.E., 1992. Piscine macrophage aggregates: a review. *Annual Review of Fish Diseases*. 2, 91-108. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90058-6](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90058-6)
- [64] Kim, K.W., Wang, X., Choi, S.M., Park, G.J., Koo, J.W., Bai, S.C., 2003. No synergistic effects by the dietary supplementation of ascorbic acid, α -tocopheryl acetate and selenium on the growth performance and challenge test of *Edwardsiella tarda* in fingerling Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research*. 34, 1053-1058. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00908.x>
- [65] Tavares-Dias, M., Schalch, S.H.C., Martins, M.L., Moraes, F.R., 2000. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivadas intensivamente em “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil. *Ars Veterinária*. 16, 76-82.
- [66] Jerônimo, G.T., Laffitte, L.V., Speck, G.M., Martins, M.L., 2011. Seasonal influence on the hematological parameters in cultured Nile tilapia from southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 71, 719-725. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000400017>
- [67] Fournier, E., Passirani, C., Montero-Menei, C.N., Benoit, J.P., 2003. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials*, 24, 3311-3331. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00161-3)

Capítulo 3 - Resposta imune adaptativa (IgM) de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) vacinadas com dispositivo polivalente de Poli(ácido láctico) como adjuvante contra *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus Agalactiae*¹

Resumo

Bacterioses por *Streptococcus agalactiae* (Sta) e *Aeromonas hydrophila* (Ah) causam severos prejuízos produtivos e econômicos no setor aquícola, além de apresentarem significativa importância em saúde pública. A profilaxia com vacinas representa uma estratégia importante para o manejo sanitário de pisciculturas no controle destas bacterioses. Neste contexto, objetivou-se avaliar a eficácia vacinal de dispositivos de PLA contendo vitamina E incorporados com bacterinas de Sta e Ah sonicadas ou não sobre a resposta imune adaptativa (IgM) de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), bem como avaliar a biocompatibilidade e biodegradação do dispositivo após implantação por via intraperitoneal (IP). Para realizar esse estudo, 120 tilápias machos ($134,96 \pm 40,31\text{g}$) foram distribuídos aleatoriamente em 4 tanques (n=30) constituindo quatro tratamentos, sendo dois com PLA contendo bacterinas sonicadas ou não (PLASon e PLACon, respectivamente) e dois tratamentos com vacinas líquidas injetáveis contendo bacterinas sonicadas ou não (VacSon e VacCon, respectivamente). Antes da vacinação, 48 peixes (12 por tanque) foram amostrados para estabelecer os padrões fisiológicos para o estudo. Após o estímulo vacinal, os peixes foram amostrados, 28, 70, 126 e 182 dias pós-implantação e vacinação (DPIV). Amostras de sangue foram utilizadas para determinação da titulação de imunoglobulina M (IgM), atividade respiratória de leucócitos (ARL). Estudo histopatológico, degradação in vivo, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e FTIR foram realizados 126 e 182 DPIV. A primeira avaliação (28 DPIV) PLASon revelou aumento ($p<0,05$) comparado ao padrão. Aos 182 DPIV PLASon e VacSon apresentaram resultados ($p<0,05$) superiores ao padrão. ARL revelou PLACon absorvência superior ($p<0,05$) ao PLASon (28 DPIV) e VacSon em todo o período estudado. A histopatologia PLASon revelou infiltrado celular intenso (182 DPI).

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico que será submetido à revista Journal of Biomedical Materials Research part A

Fagocitose e crescimento celular intenso foram observados nos dois dispositivos aos 126 e 182 DPI, respectivamente. PLASon apresentou maior perda de peso aos 182 DPI, a análise de MEV revelou irregularidades na superfície dos dois dispositivos após 182 DPI. A FTIR revelou deslocamento das bandas 1750 e 1450 cm^{-1} aos 182 DPI diferentemente dos dispositivos PLASon. A resposta imunológica por elevação na titulação de IgM e a manutenção principalmente do dispositivo PLASon por período semelhante ao período de criação da tilápia e degradação demonstram que a nossa formulação é biocompatível e biodegradável. Tais fatos nos levam a crer que o PLA incrementa a resposta imune como adjuvante dos dispositivos vacinais polivalentes de liberação lenta sendo promissores na prevenção de doenças infecciosas.

Palavras-chave: PLA; Biomateriais; Resposta imunológica; Imunoglobulina sérica

1. Introdução

A produção de peixes de água doce é realizada em todos os estados do Brasil. Dos 27 estados da federação, Rondônia, Amazonas e Roraima são os únicos a não produzir tilápias [1]. De acordo com dados obtidos no portal sidra do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE [1], a produção somente de tilápias no Brasil em 2020 foi de 343.595 toneladas um aumento na produção de 6,13% em relação ao ano anterior. Em valores monetários a produção de pescado faturou 5,96 bilhões sendo a tilapicultura responsável por 2,30 bilhões (38,6% do faturamento).

Nesse cenário de criação, doenças causadas por bactérias causam grande prejuízo econômico estimado em 84 milhões de dólares por ano [2] dentre os agentes bacterianos destacam-se o *Streptococcus agalactiae* (Sta) e *Aeromonas hydrophila* (Ah) [3;4]. Além disso, a Ah é associada a doenças em humanos por disseminação pela água ou alimentos contaminados [5].

A prevenção de doenças utilizando a vacinação no setor aquícola é o método mais adequado para o controle de patógenos. Entretanto, vacinas inativadas as quais utilizam patógenos mortos ou subunidades são consideradas fracamente imunogênicas [6]. Vacinas polivalentes contra Sta e Ah por imersão produziram anticorpos específicos para os agentes patológicos avaliados por 21 dias [7] e 100 dias [8].

Porém, os resultados de sobrevivência são variáveis entre os estudos. Assim, os adjuvantes são necessários e são utilizados para aumentar a potência e a longevidade das respostas imunes específicas podendo até ser 100% protetoras contra certos patógenos [6; 9].

Na busca por vacinas cada vez mais efetiva inúmeros adjuvantes são testados buscando melhora imunológica [10]. Um importante aspecto da resposta imune do peixe contra o adjuvante é o reconhecimento dos patógenos por meio de padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs) conservados, dos receptores de reconhecimento padrão (RRPs) e receptores *Toll Like* (TLRs) [6]. Nesse universo o Poli(ácido láctico) (PLA) se enquadra nesses requisitos pois, após sua implantação este biomaterial é reconhecido por macrófagos por meio de RRP e receptores semelhantes aos TLRs. Diante dessa estimulação clássica, os macrófagos secretam citocinas inflamatórias e espécies de oxigênio reativo (EROs), parte essencial da defesa do hospedeiro [11].

A incorporação de componentes biológicos a dispositivos de PLA como a vitamina E (VitE) pode ser vantajoso, pois melhora a resposta imune observada pelo aumento pontos de fagocitose e incrementa a capacidade fagocítica de tilápias do Nilo após a implantação por via intraperitoneal (IP) e subcutânea (SC) [12]. Esse incremento na capacidade fagocítica se dá pela fusão de macrófagos e formação de células gigantes de corpo estranho (CGEC) [13]. Ademais, o enriquecimento do PLA com VitE melhora a hemocompatibilidade e biocompatibilidade [14].

Revisado por Nayak [10] micropartículas ou microesferas de PLA com diferentes partes de *Aeromonas hydrophila* produzem 60% de proteção vacinal em carpas rohu (*Labeo rohita*). Quando incorporado somente antígeno proteico da membrana externa ao PLA a proteção é de 80%. A inoculação do antígeno proteico da membrana produz uma proteção de 65%. O autor conclui que apesar do sucesso nos estudos experimentais com adjuvantes de micro e nanopartículas não há vacinas disponíveis contra várias doenças (polivalentes).

Diante do exposto, os dados mostram o potencial do PLA como veículo vacinal e a capacidade de induzir uma resposta imune mais potente. Assim, objetivou-se acrescentar bacterinas de *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus Agalatae* sonificados ou não em PLA incorporados com vitamina E como dispositivos vacinais

polivalentes avaliando a resposta imunológica (IgM), biocompatibilidade e biodegradação após implantação por via intraperitoneal em tilápias do Nilo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais e desenho experimental

Para realizar este estudo, 120 tilápias machos ($134,96 \pm 40,31\text{g}$), da fazenda Aquabel (Porto Ferreira, SP, Brasil) e pertencentes à mesma desova, foram distribuídos aleatoriamente em 4 tanques (1000 L de água, $n = 30$ peixes cada) com sistema de recirculação a uma vazão de $5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, realizando os seguintes tratamentos: PLACon (PLA + VitE + bacterinas Sta e Ah); PLASon (PLA + VitE + bacterinas Sta e Ah sonicada); VacCon (adjuvante + bacterinas Sta e Ah); VacSon (adjuvante + bacterinas Sta e Ah sonicada). Os peixes foram criados neste sistema por dois meses antes de iniciar o estudo com a implantação dos dispositivos vacinais ou receberem a vacina. Os peixes foram alimentados com 2% de biomassa com ração comercial (Nutripiscis® - Neovia Company, 28% GP e 4000 kcal de GE kg^{-1}). Os parâmetros de qualidade da água foram determinados diariamente utilizando pHmetro com condutímetro (modelo YSI-63) e oxímetro (modelo YSI-55), e seus valores permaneceram dentro da faixa adequada para o conforto de peixes tropicais [15] (oxigênio dissolvido = $4,00 \pm 0,80 \text{ mg L}^{-1}$; temperatura = $26,87 \pm 2,15 \text{ °C}$; pH = $7,61 \pm 0,64$; e condutividade = $206,23 \pm 95,59 \text{ }\mu\text{S/cm}$). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista, FCAV-UNESP, protocolo nº 08361/19.

2.2 Dispositivo vacinais de poli(ácido láctico) e vacina

Os dispositivos de poli(ácido láctico) (PLA) e as vacinas foram preparados em quatro formulações: PLA mais vitamina E (VitE) mais bacterinas (PLACon); PLA mais VitE mais bacterinas sonicada (PLASon); vacina líquida mais bacterinas (VacCon); vacina líquida mais bacterinas sonicada (VacSon). Basicamente, 500 mg de poli(ácido láctico) (grau PLA: Ingeo 3251D, fabricado pela NatureWorks Co., Ltd) foram dissolvido

em diclorometano (DCM) agitando por 20 minutos. A vitamina E foi adicionada as duas soluções de PLA dissolvido (PLACon e PLASon) [16].

Para solução no PLA tanto as bacterinas (Ah e Sta) quanto as bacterinas sonicadas (Ah e Sta) foram misturadas (em dois tubos diferentes) e centrifugadas $6000 \times g$ por 20 min a 4°C , o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 500 microlitros (μL) de DCM (solução final 1:3) e incorporados as misturas de PLA + VitE (PLACon e PLASon) e agitados por 10 minutos. Assim, PLACon ou PLASon foram colocados em capilares de vidro mantidos à temperatura ambiente durante quatro dias para secagem. Os dispositivos foram retirados dos capilares e seccionados com um centímetro (cm^{-1}) de comprimento (patente número BR 10 2020 026197 5). Cada dispositivo de 1 cm^{-1} apresentava concentração de $4,6 \times 10^6$ UFC de Sta e $4,6 \times 10^8$ UFC de Ah.

Para produção das vacinas líquidas as bacterinas (sonicadas ou não) foram misturadas (Ah e Sta) como descrito anteriormente e emulsificadas a 15% com adjuvante comercial Montanide™ Gel 02 (Seppic Brasil EQCI Ltda) de acordo com fabricante, obtendo uma concentração de $4,6 \times 10^6$ UCF de Sta e $4,6 \times 10^8$ UCF de Ah igualmente descrito para os dispositivos vacinais.

2.3 Preparação do inóculo bacteriano

A bacterina produzida com cepa de *Aeromonas hydrophila* (depositada no NCBI GenBank sob o número de acesso – NR 042155.1) isolada a partir de peixes infectados naturalmente [17]. A cepa de Ah foi cultivada em caldo de soja triptona (TSB) por 24 h a 28°C . A massa bacteriana foi obtida por centrifugação ($6000 \times g$ por 20 min, a 4°C) após três lavagens sucessivas com solução de PBS estéril (pH 7,2) para remoção completa do meio de cultura. O sedimento bacteriano foi ressuspenso em PBS (solução salina tamponada com fosfato) até a concentração de $1,0 \times 10^9$ UFC/ mL^{-1} .

Da mesma forma a bacterina produzida com cepas de *Streptococcus Agalactiae* (ATCC 13813) fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia Veterinária FCAV-UNESP. A cepa de Sta foi cultivada em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco, Detroit, MI, USA) a 28°C por 48 h. A obtenção da massa bacteriana foi obtida por

mesma metodologia aplicada a Ah. O sedimento bacteriano foi ressuspensão em PBS (solução salina tamponada com fosfato) até a concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL⁻¹. A inativação foi realizada com formalina a 1% (v:v) a 4°C durante a noite [18]. As bactérias inativadas foram novamente centrifugadas a 6000×g por 20 min a 4°C e lavadas três vezes com solução de PBS estéril (pH 7,2) para remoção completa da formalina a ser ressuspensa novamente em PBS.

Parte da bacterina produzida, ao final do processo de lavagem para retirada da formalina foi ressuspensa em solução de NaCl 0,85% e sonificadas três vezes por 30 segundos na potência de 150W, em sonificador Sonifer (Branson®). Após o processo de sonificação realizou-se novamente centrifugação a 6000×g por 20 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensa em solução de PBS estéril (pH 7,2) estocadas até o uso.

2.4 Implantação e vacinação

Antes da implantação e vacinação, os dispositivos foram imersos em etanol 70% por uma hora e secos em estufa [19; 20]. Em seguida, os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína 1:10.000 (v:v) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri 63178, EUA), e utilizando um aplicador AnimalTag® comercial, 1 dispositivo foi implantado intraperitonealmente (IP) por peixe (PLACon ou PLASon). A vacina foi aplicada por via IP na dose de 0,5 mL⁻¹ por peixe.

2.5 Coleta de sangue

Os peixes foram anestesiados, vide item 2.4, para obtenção de amostras de sangue do vaso caudal. Antes da implantação e vacinação (dia 0) foram realizadas coletas de 12 peixes (n = 12 / por tanque) aleatoriamente totalizando 48 amostras para compor o padrão. Após implantação e vacinação (DPIV), doze peixes (n = 12) por tanque eram pescados aleatoriamente nos dias 28 e nos dias 70, 126, 182 (n = 12 peixes / tanque foram pescados aleatoriamente). Para a coleta de amostras de sangue, utilizando-se dois conjuntos de agulha e seringa um revestido com heparina de lítio e outro sem anticoagulante para obtenção do plasma e amostras de soro,

respectivamente. Nos 126 e 182 DPIV após a coleta de sangue, 7 peixes ($n = 7$ / tanque) por grupo (PLACon; PLASon; VacCon; VacSon) foram eutanasiados por exposição prolongada à solução hidroalcoólica de benzocaína 1:500 (v:v).

2.6 Atividade respiratória de leucócitos (ensaio de NBT)

A atividade respiratória de leucócitos foi mensurada de acordo com Farias et al. [21]. Para isso, 100 μ L de sangue heparinizado foi misturado com 100 μ L de uma solução tamponada com NBT a 0,2% (NBT-nitroblue tetrazolium, Sigma, St. Louis, MO, EUA). Esta solução foi homogeneizada e incubada em sala escura por 30 min a 25°C. Após a incubação, 50 μ L da solução foi adicionado a 1 mL de n,n-dimetilformamida (DMF, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e centrifugado a 3000 g por 5 min. A densidade óptica do sobrenadante foi medida usando um espectrofotômetro (Beckman DU-70S) com comprimento de onda de 540 nm.

2.7 Elisa indireto para determinação da concentração sérica de anticorpos (IgM)

Para quantificar/detectar os anticorpos séricos específicos para *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*, primeiramente metade da placa foi sensibilizada (Coat) com ambas as bactérias (Ah e Sta) na concentração 1×10^8 UFC diluídas em tampão carbonato de sódio (pH 9,6), concentração 1/1000, colocando-se 100 μ L/poço *over night* à 4°C. Em seguida, foi realizado três lavagens da placa inteira com solução de Tween 20 (0,05%) diluída em PBS pH 7,2 – 7,4 (300 μ L/poço). Para o bloqueio utilizou-se solução de BSA (1%) – sacarose (5%) diluído em PBS (200 μ L/poço) por uma hora à 37°C. Ato contínuo, foi realizado quatro lavagens com solução de Tween 20 (0,05%) diluída em PBS pH 7,2 – 7,4 (300 μ L/poço) e, posteriormente pipetagem das amostras dos peixes imunizados.

Para isso, as amostras de soro foram diluídas em solução de BSA (1%) em PBS/Tween 20 (0,05%) a razão de 1:10, utilizando 100 μ L/poço por duas horas em 37°C. Em seguida, foi realizado quatro lavagens das placas com Tween 20 (0,05%) diluída em PBS pH 7,2 – 7,4 (300 μ L/poço). O primeiro anticorpo anti-tilápia (IgG

produzida em coelhos anti-IgM Tilápia) foi diluído em BSA (1%) em PBS/Tween 20 (0,05%) razão 1:1000 adicionado 100 µL/poço, mantido por uma hora em 37°C. Após esse período, foi realizado quatro lavagens da placa em Tween 20 (0,05%) em PBS pH 7,2 – 7,4 (300 µL/poço).

Diluído 1:2000 em solução de BSA (1%)/Tween 20 (0,05%) em PBS o anticorpo conjugado anti-coelho peroxidase (Sigma-Aldrich®; Merk, Darmstadt Alemanha) foi pipetado 100 µL/poço mantendo-o por uma hora a 37°C. Continuamente, foi realizado quatro lavagens nas placas empregando diluição de Tween 20 (0,05%) em PBS pH 7,2 – 7,4 (300 µL/poço). Em seguida foi adicionado substrato (100 µL/poço) de tetrametilbenzidina (TMB), mantido por 25 minutos no escuro. Para a revelação, foi adicionado 50 µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 30% e, realizada a leitura em densidade óptica (D.O.) 450 nm.

2.8 Estudo Histopatológico

Os dispositivos implantados IP foram coletados com o omento e amostras de omento dos peixes vacinados (VacCon e VacSon) foram retirados para análise 126 e 182 dias pós-implantação e vacinação (DPIV). Para tanto, amostras dos implantes poliméricos e omento foram fixadas em solução de paraformaldeído 4%, diafanizadas em série crescente de álcool, clarificadas em xilol e incluídas em parafina. Secções de 5µm foram corados com hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram digitalizadas utilizando câmera Bx61VS (Olympus Corporation, Tóquio, Japão) com ampliação de 400x, acoplado a um microscópio Olympus VS120 Virtual Microscope Slide Scanning System (VS120-S5) Tóquio, Japão. Para avaliação histopatológica e registro fotomicroscópico foi utilizado software OlyVIA 3.2, Olympus. Um patologista experiente realizou análises histopatológicas de forma cega e os achados histológicos relacionados aos implantes poliméricos e ao omento foram classificados semiquantitativamente por meio de um escore numérico: 1-reação leve, 2-reação moderada, 3-reação intensa e 4-reação grave, de acordo com os critérios propostos por De Jong et al. [22].

2.9 Caracterização dos dispositivos

2.9.1 Estudo de degradação *in vivo*

Para isso, as massas dos dispositivos PLACon (n=10) e PLASon (n=10) foram medidas antes de serem implantados. Durante o último período amostral estabelecido (182 DPI), os implantes foram recuperados (n=3 por grupo; PLACon ou PLASon) lavados três vezes com água destilada, secos a 35°C por 12 horas e pesados. A perda de peso dos implantes foi estimada pela seguinte Equação:

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

P_i = massa inicial antes da implantação

P_f = massa final 182 dias pós-implantação

2.9.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Por meio de MEV analisou-se a morfologia dos dispositivos. Amostras não implantadas de PLACon e PLASon foram criofraturadas após imersão em nitrogênio líquido por 6 segundos. Os polímeros degradados *in vivo* (n=3 por grupo; PLACon ou PLASon) foram processado manualmente por imersão em nitrogênio líquido, secos em estufa a 35 ° C por 12 h, pulverizados por ouro sob vácuo. A superfície foi analisada utilizando um Zeiss EVO MA10 (Zeiss, Oberkochen, GER) regulado em 7,32 kV [23].

2.9.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas em equipamento Perkin Elmer, modelo Spetrum 100, equipado com um acessório de reflectância atenuada com cristal de seleneto de zinco. As análises foram realizadas com números de onda variando entre

4000 e 600 cm^{-1} com 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} no modo de reflectância total atenuada (ATR). Antes de se iniciar os ensaios, foi realizado o *background* de leitura da máquina com os mesmos parâmetros adotados para ensaio. As amostras dos dispositivos PLACon e PLASon coletados 126 e 182 DPI foram triturados até que ficassem sob forma de pó. A temperatura ambiente, o pó compactado foi colocado diretamente sobre o cristal com aplicação de força de aproximadamente 50 N.

2.10 Análise estatística

As variáveis categóricas foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Um modelo linear incluindo efeitos fixos para tratamento e interação tratamento-tempo para implante e vacinação foram realizados. As diferenças entre os tratamentos foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis. As análises foram realizadas no programa Sigma-Plot, versão 12.0. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram estimadas com base no teste de Dunn's.

3. Resultados

3.1 Concentração sérica de imunoglobulina M (IgM)

A Figura 1 revela a dosagem sérica de IgM de tilápias do Nilo antes da implantação e vacinação (padrão, dia 0) e após 28, 70, 126 e 182 DPIV. A dosagem de IgM pós-implantação e vacinação (28, 70, 126 e 182) não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos (PLASon, PLACon, VacCon e VacSon). A primeira avaliação 28 dias pós-implantação e vacinação (DPIV) revelou valores de IgM (contra Ah e Sta) estatisticamente superiores ($p < 0,05$) no grupo implantado com PLA + VitE e bactérias sonicadas (PLASon) comparado ao padrão inicial do experimento (dia 0). No mesmo período os grupos PLACon, VacCon e VacSon apresentaram aumento na concentração de IgM, porém, sem diferença estatística ($p > 0,05$) comparado ao padrão (Figura 1). Ao longo do período experimental de 70 e 126 DPIV, os grupos apresentaram aumentos significativos ($p < 0,05$) nas dosagens de IgM comparados ao padrão. Interessante notar que os VacCon e PLACon apresentaram redução

significativa ($p < 0,05$) aos 182 DPVI comparado aos 70 e 126 DPIV não diferindo estatisticamente do padrão. No mesmo período (182 DPIV) os grupos utilizando a bacterinas sonicadas (PLASon e VacSon) tiveram concentrações de IgM estatisticamente superiores ($p < 0,05$) ao padrão.

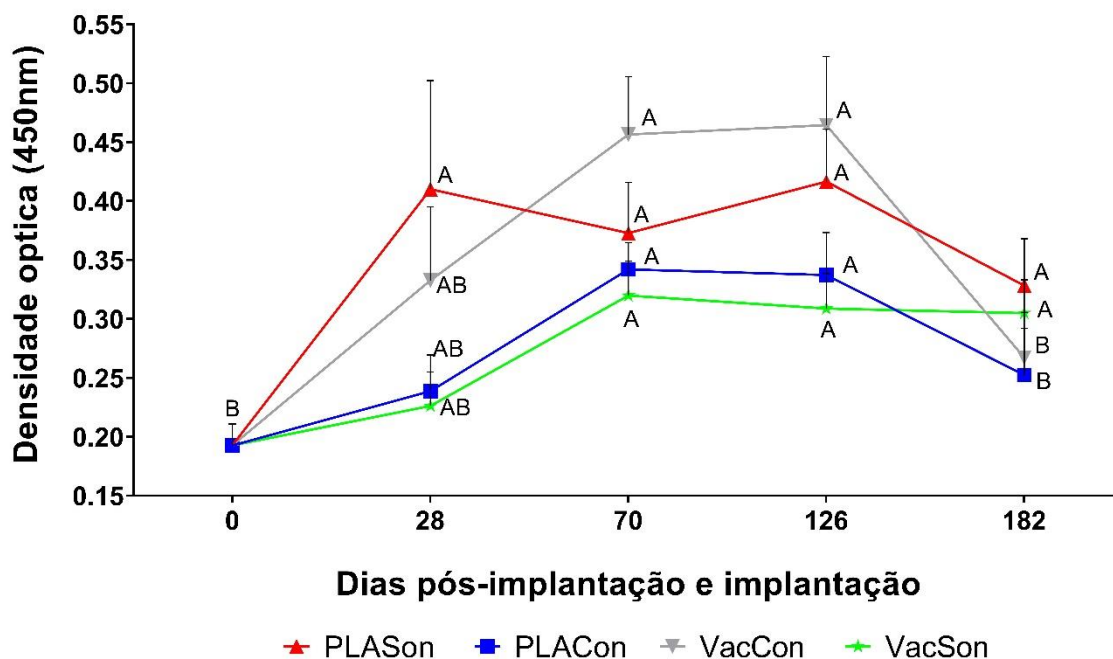


Figura 1. Valores médios ($\pm$ Erro Padrão) da concentração sérica de imunoglobulinas M (IgM) contra *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* observados em soro de tilápias pós-implantação e vacinação. Médias avaliadas por Kruskal-Wallis seguidos da mesma letra não diferem no teste de Dunn's ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam cada tratamento ao longo do tempo experimental. Período de amostragem: 0 (padrão, $n = 12$ peixes por tanque; total = 48 peixes), 28 ($n = 12$ peixes por tanque), 70, 126, 182 ($n = 24$ peixes por tanque por período amostrado) DPIV. Tratamentos: PLACon [poli(ácido láctico) + VitE + bacterinas]; PLASon [poli(ácido láctico) + VitE + bacterinas sonicadas]; VacCon [15% de adjuvante + bacterinas]; VacSon [15% adjuvante + bacterinas sonicadas].

3.2 Atividade respiratória de leucócitos

A atividade respiratória de leucócitos (Figura 2) revelou aumento significativo ($p < 0,05$) do grupo PLACon comparados aos grupos PLASon e VacSon (28 DPIV) e ao VacCon (126 DPIV). Durante todo período estudado a diferença significativa ($p < 0,05$) entre PLACon e VacSon se manteve. As tilápias implantadas com PLASon

apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) comparado ao VacSon 70 e 182 DPIV. Ao longo do experimento, os grupos PLACon e PLASon apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) aos 70 DPIV quando comparados a 28 DPIV, se mantendo por todo o período experimental. Os peixes vacinados com bacterinas (VacCon) apresentaram maior atividade respiratória ($p < 0,05$) aos 182 DPIV comparado aos 28 e 70 DPIV.

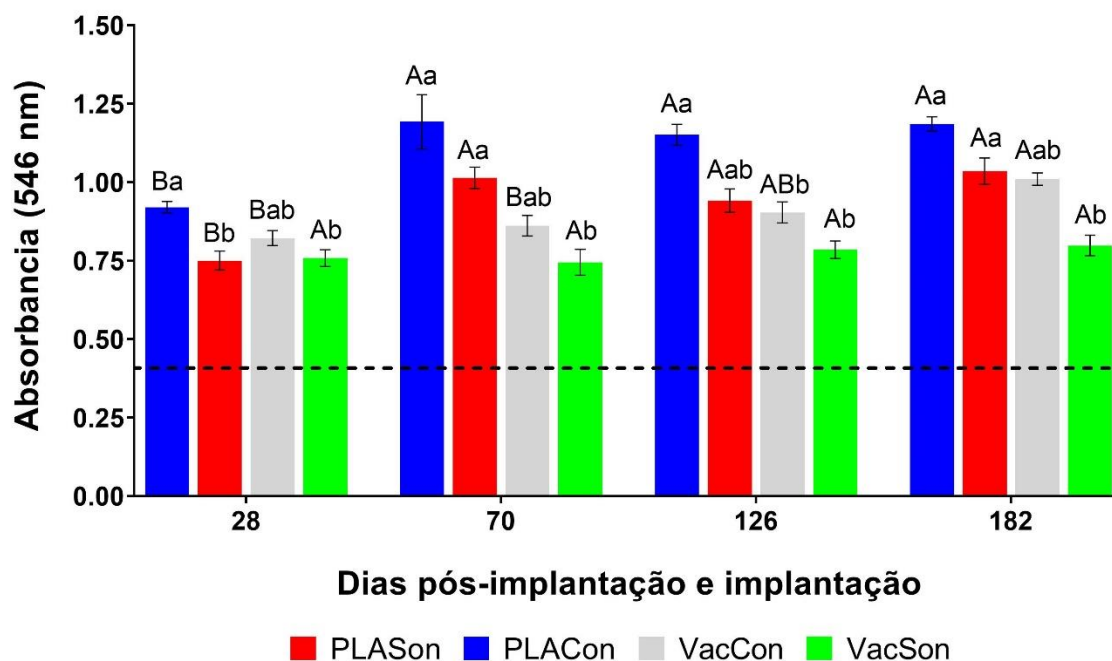


Figura 2. Valores médios ($\pm$ Erro Padrão) da atividade respiratória de leucócitos observados em soro de tilápias pós-implantação e vacinação. Médias avaliadas por Kruskal-Wallis seguidos da mesma letra não diferem no teste de Dunn's ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam cada tratamento ao longo do tempo experimental. Letras minúsculas comparam os tratamentos em cada período. Período de amostragem: 0 (padrão, linha pontilhada; $n = 12$ peixes por tanque; total = 48 peixes), 28 ($n = 12$ peixes por tanque), 70, 126, 182 ($n = 24$ peixes por tanque por período amostrado) DPIV. Tratamentos: PLACon [poli(ácido láctico) + VitE + bacterinas]; PLASon [poli(ácido láctico) + VitE + bacterinas sonicadas]; VacCon [15% de adjuvante + bacterinas]; VacSon [15% adjuvante + bacterinas sonicadas].

Interessante ressaltar que na análise de correlação entre a atividade respiratória de leucócitos e valores absolutos de imunoglobulinas (IgM) apresentados na Tabela 1, os grupos PLACon e VacSon apresentaram resultados significativos negativos de 66,4% e 75,1% ($p < 0,001$), respectivamente aos 182 DPIV.

Tabela 1. Análise de correlação entre os valores de atividade respiratória de leucócitos e os valores de absorbância de imunoglobulinas de tilápias pós-implantação e pós-vacinação.

Parâmetros	Grupos ²	Período	Análise de Correlação	
Correlaciados ¹		Experimental ³	ρ ⁴	Prob > $ \rho $ ⁴
Valores de absorbância X Atividade Respiratória de Leucócitos	PLACon	28	0,217	0,484
		70	0,321	0,220
		126	0,573	0,006
		182	-0,664	<0,001
	PLASon	28	0,315	0,306
		70	0,313	0,176
		126	-0,268	0,213
		182	0,066	0,766
	VacCon	28	0,182	0,557
		70	0,048	0,836
		126	0,348	0,120
		182	-0,202	0,426
	VacSon	28	0,091	0,766
		70	0,245	0,245
		126	0,069	0,755
		182	-0,751	<0,001

¹ Imunoglobulinas = valores absolutos de absorbância; Atividade de exposição respiratória (ensaios NBT).

² Correlação entre os peixes dentro de cada tratamento.

Todos os tratamentos contém *Aeromonas Hydrophila* + *Streptococcus Agalactiae*. PLACon [poli(ácido láctico) + Vitamina E + bacterinas; n=84].

PLASon [poli(ácido láctico + Vitamina E + bacterinas sonicadas; n=84].

VacCon [bacterinas + adjuvante comercial 15%; n=84].

VacSon [bacterinas sonicadas + adjuvante comercial 15%; n=84].

³ Dias pós-implantação e pós-vacinação.

⁴ ρ = Coeficiente de Correlação de Spearman; Prob.> $|\rho|$ – Probabilidade de significância do valor p.

3.3 Caracterização dos dispositivos

3.3.1 Histopatologia

A avaliação histopatológica 126 e 182 dias pós-implantação (DPI) representadas na figura 3 associada a classificação por escores de pontuação (Figura 4) representados em mapa de calor (“heatmap”) auxiliam na avaliação dos resultados pois, o gradiente de branco e azul analisa o contraste de escores (intensidade da reação) em que branca indica resposta mínima ou ausente e a cor azul, uma reação mais exacerbada.

A primeira avaliação 126 DPI revelou cápsula fibrótica moderada no grupo PLASon em torno do dispositivo (Fig. 4A). Macrófagos pavimentados ao longo da cápsula fibrótica e em projeções teciduais no dispositivo foram observados nos grupos PLASon e PLACon aos 126 e 182 DPI (Fig 3A, C, E, G). As tilápias implantadas com PLASon apresentaram infiltrado celular moderado (126 DPI) e intenso (182 DPI), já os peixes que receberam o PLACon apresentaram infiltrado moderado aos 182 DPI (Fig 4B). Células granulocíticas eosinofílicas e melanomacrófagos no omento e cápsula fibrótica foram visualizados principalmente ao entorno de pontos de fagocitose no PLASon (Fig 3B, C, D) e PLACon (Fig, F). Em alguns pontos essas células estavam aglomeradas no omento 126 DPI (Fig 3A) e na cápsula 182 DPI (Fig 3C) nas implantações de dispositivos PLASon nas tilápias.

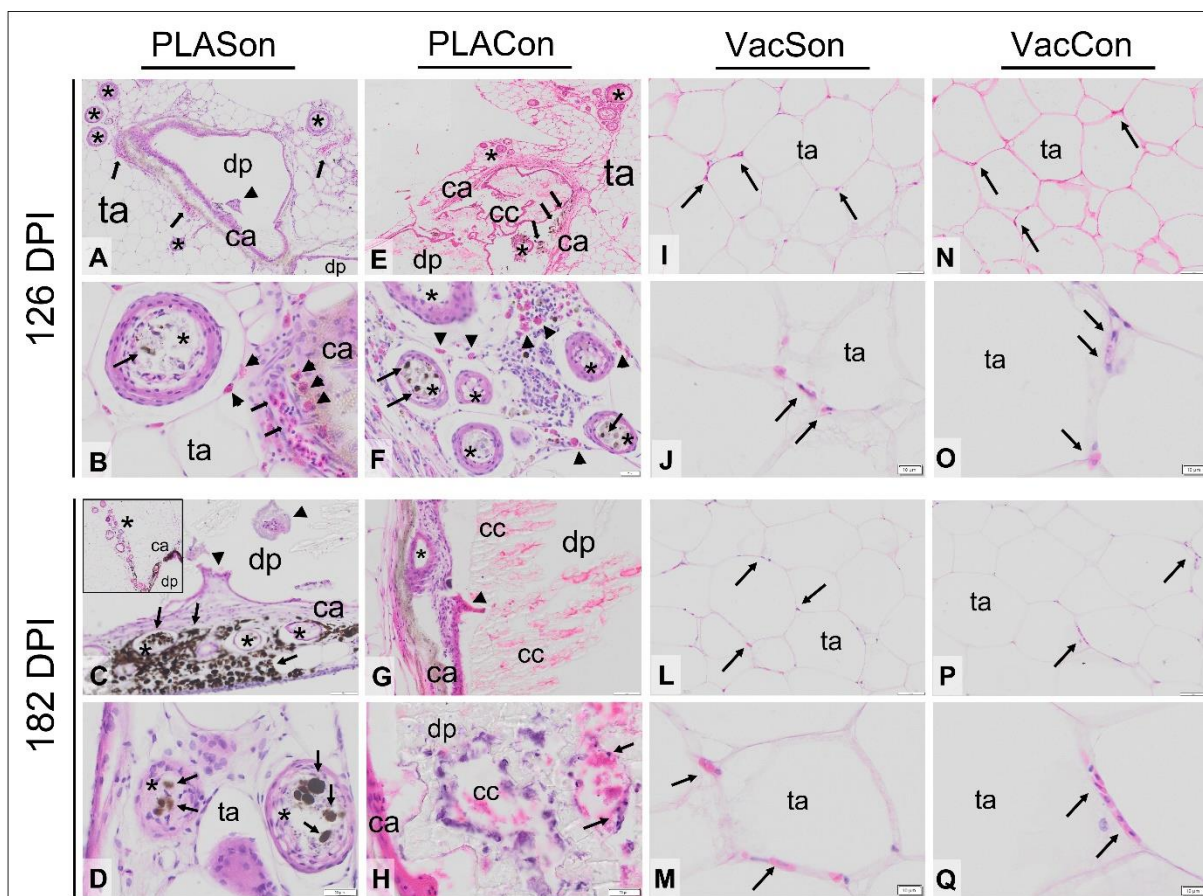


Figura 3. Fotomicrografias de PLASon, PLACon, VacSon e VacCon implantados e inoculados por via intraperitoneal em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) corados com hematoxilina-eosina (H&E). **(A)** PLASon apresentando infiltrado mononuclear inflamatório difuso no omento adjacente a cápsula fibrótica (ca) em uma parte polimérica desprendida do dispositivo (dp) implantado, células granulocíticas eosinofílicas ao redor da cápsula (setas pretas), crescimento celular dentro do dispositivo (cabeça de seta) e pontos de fagocitose (*) com células gigantes de corpo estranho (CGCE) no tecido adiposo do omento (ta) (barra = 200 μ m). **(E)** PLACon com intenso crescimento celular dentro do dispositivo (dp) formando ponte entre as cápsulas fibróticas iniciais (ca), pontos de fagocitose com CGCE (*) no tecido adiposo do omento (ta) e dentro do dispositivo implantado e melanomacrófagos entorno (setas pretas) (barra = 200 μ m). **(B)** PLASon e **(F)** PLACon apresentando pontos de fagocitose (*) com melanomacrófagos no interior das CGCE (setas finas), células granulocíticas eosinofílicas degranuladas (cabeça de seta) e células granulocíticas eosinofílicas entorno das CGCE (B e F; barra = 20 μ m). **(I - J)** VacSon e **(N - O)**

VacCon tecido adiposo (ta) do omento com células granulocíticas eosinofílicas e macrófagos (setas pretas) (I e N; barra = 50 μm ; J e O; barra = 10 μm). **(C insete)** PLASon apresentando grande quantidade de pontos de fagocitose CGCE no omento próximo a cápsula (ca) e ao dispositivo implantado (dp) (barra = 200 μm). **(C)** Cápsula fibrótica (ca) com três pontos de fagocitose (*) grande quantidade de melanomacróforos entorno das CGCE e no interior destas células (setas pretas), projeções teciduais e crescimento celular (cabeça de seta) no dispositivo (dp) (barra = 50 μm). **(G)** PLACon apresentando moderado infiltrado inflamatório mononuclear e ponto de fagocitose (*) na cápsula fibrótica (ca), projeção tecidual (cabeça de seta) e crescimento celular no dispositivo (dp) (barra = 50 μm). **(D)** PLASon células gigantes de corpo estranho fagocitando partes do dispositivo (*) no tecido adiposo do omento (ta) com melanomacróforos no interior (setas pretas) (barra = 20 μm). **(H)** PLACon intenso crescimento celular (cc) e células inflamatórias (setas pretas) no interior do dispositivo (dp) (barra = 20 μm). **(L – M)** VacSon e **(P – Q)** VacCon tecido adiposo do omento (ta) com poucas células granulocíticas eosinofílicas (setas pretas) (L e P; barra = 50 μm ; M e Q; barra = 10 μm).

Verificou-se células gigantes de corpo estranho (CGCE) em maior intensidade nos dois dispositivos implantados 126 DPI (Fig 4C), fagocitando pequenos pedaços do dispositivo presentes dentro destas células no PLASon (Fig 3A, B) e PLACon (Fig 3E, F). Além disso, melanomacróforos foram visualizados no interior das CGCE nos dois períodos avaliados nos dispositivos (Fig 3B, F, C, D), ainda, células granulocíticas eosinofílicas degranuladas e não degranuladas estão presentes fora das CGCE. Pontos de fagocitose aglomerados foram observados no omento (Fig 3C, insete) e grande quantidade melanomacróforos na cápsula fibrótica aos 182 DPI em implantes de PLASon.

O crescimento celular no dispositivo foi mais intenso aos 182 DPI (Fig 4D), grande quantidade de células e tecido foram observados, a figura 3E mostra formação de cápsula dentro do polímero gerando uma ponte celular entre os dois extremos do dispositivo. Os peixes vacinados com adjuvantes comerciais VacSon e VacCon, não apresentaram nenhuma reação no omento nos dois momentos analisados (3I, N, J,

O, L, P, M, O) foi possível visualizar células granulocíticas eosinofílicas no tecido adiposo e poucos macrófagos.

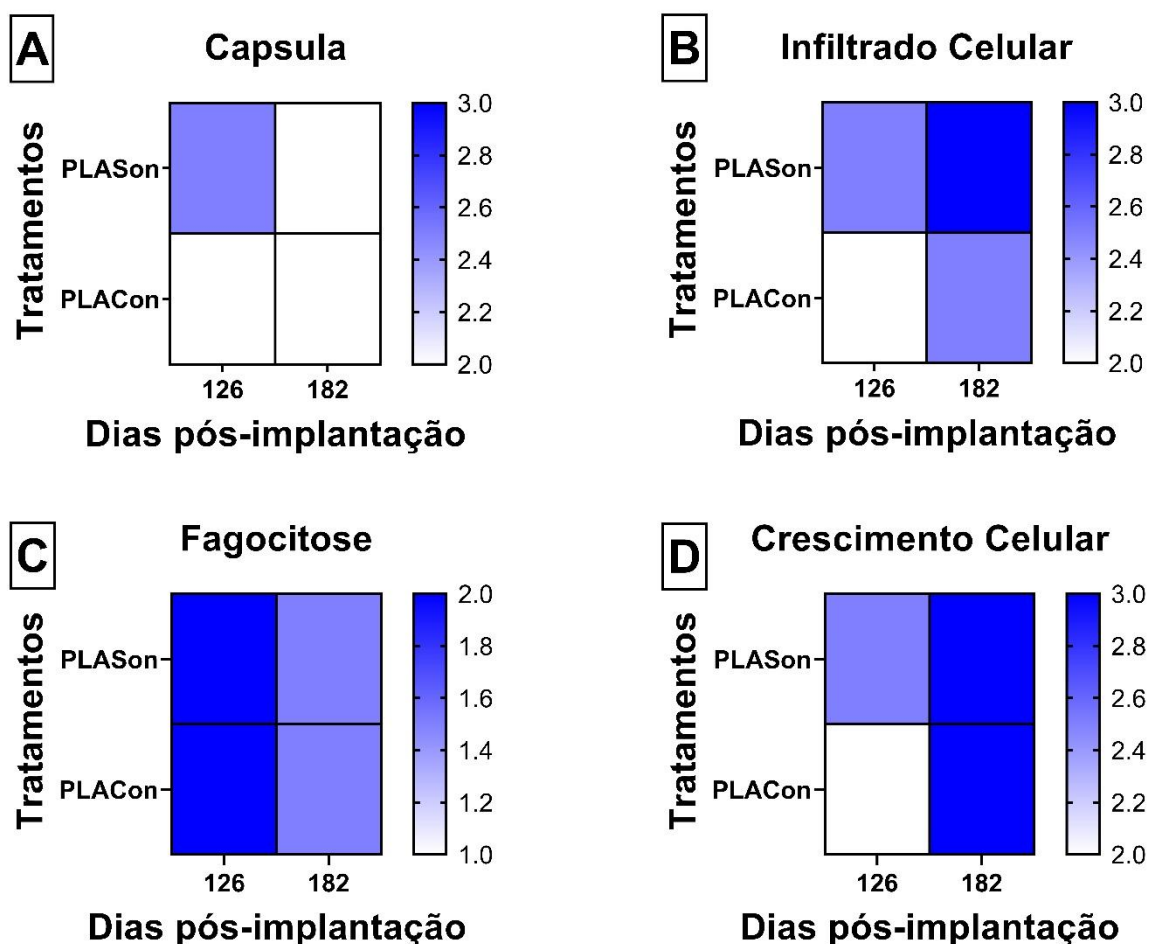


Figura 4. Mapa de calor (*Heatmap*) dos escores de resposta tecidual 126 e 182 dias pós-implantação (DPI) por via intraperitoneal em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A intensidade do grau de cor (gradiente de cor) representa a severidade do escore, em que o azul mais escuro (intenso) significou uma reação tecidual mais acentuada (**A**, **B**, **C** e **D**). O agrupamento no nível de dias pós-implantação (DPI) foi construída na parte inferior e as reações teciduais dos grupos avaliados foram construídas no lado esquerdo, mostrando a relação entre os pontos de tempo (DPI) e a análise histopatológica. A reação tecidual inflamatória característica ao implante foi classificada semiquantitativamente por escores [12; 21; 22]. 1- reação leve; 2- reação moderada; 3- reação intensa; 4- reação grave. Coloração hematoxilina-eosina (H&E).

3.3.2 Estudo de degradação *in vivo*

Os dispositivos recuperados e pesados após o período experimental de 182 dias pós-implantação demonstraram massas diferentes (Figura 5). Os dispositivos produzidos com bacterinas sonicadas apresentaram perda de massa média de 9,64%. Em contrapartida, os dispositivos produzidos com bacterinas apresentaram ganho de massa médio de 5,62%.

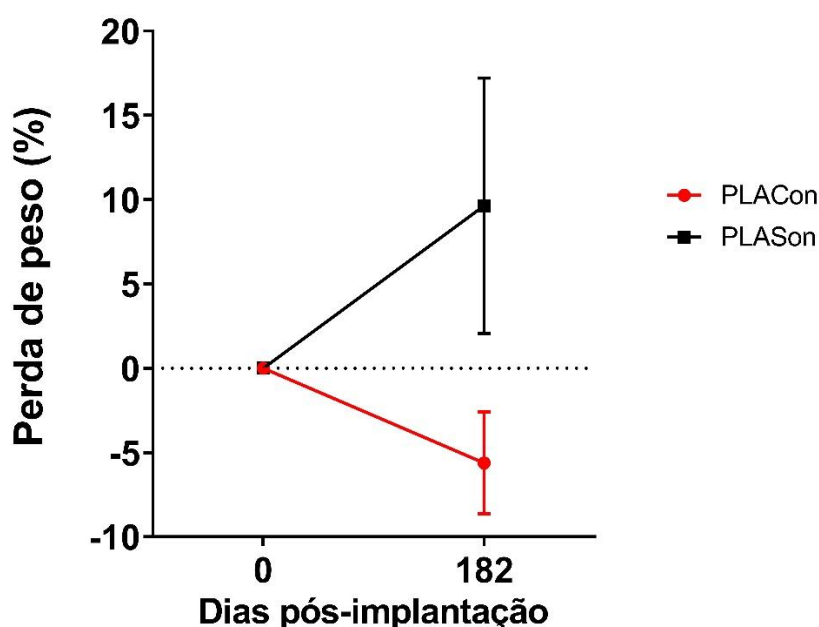


Figura 5. Valores médios ($\pm$ Erro Padrão) do estudo de degradação *in vivo* obtidos antes da implantação (n=10) e 182 dias pós-implantação (DPI) (n = 3 dispositivos coletados aleatoriamente). Tratamentos: PLACon [poli(ácido láctico) + VitE + bacterinas]; PLASon [poli(ácido láctico) + VitE + bacterinas sonicadas].

3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As Figuras 6A e 6B exibem os dispositivos antes da implantação com morfologia densa sem poros. As micrografias eletrônicas de superfície do PLA produzido com bacterinas (PLACon) e do PLA produzido com bacterinas sonicadas (PLASon) expostas à degradação *in vivo*, implantadas via IP apresentaram mais

irregularidades após 182 dias do que no início do teste. A figura 6D apresenta mais irregularidade na superfície sugerindo degradação. Além disso, em ambos os dispositivos (Fig 6C e D) pode-se observar artefato circular aderido ao material. Na micrografia 6D (*inset*) é possível observar que esses artefatos estão aderidos em depressões na superfície sugerindo células fagocíticas aderidas ao material polimérico.

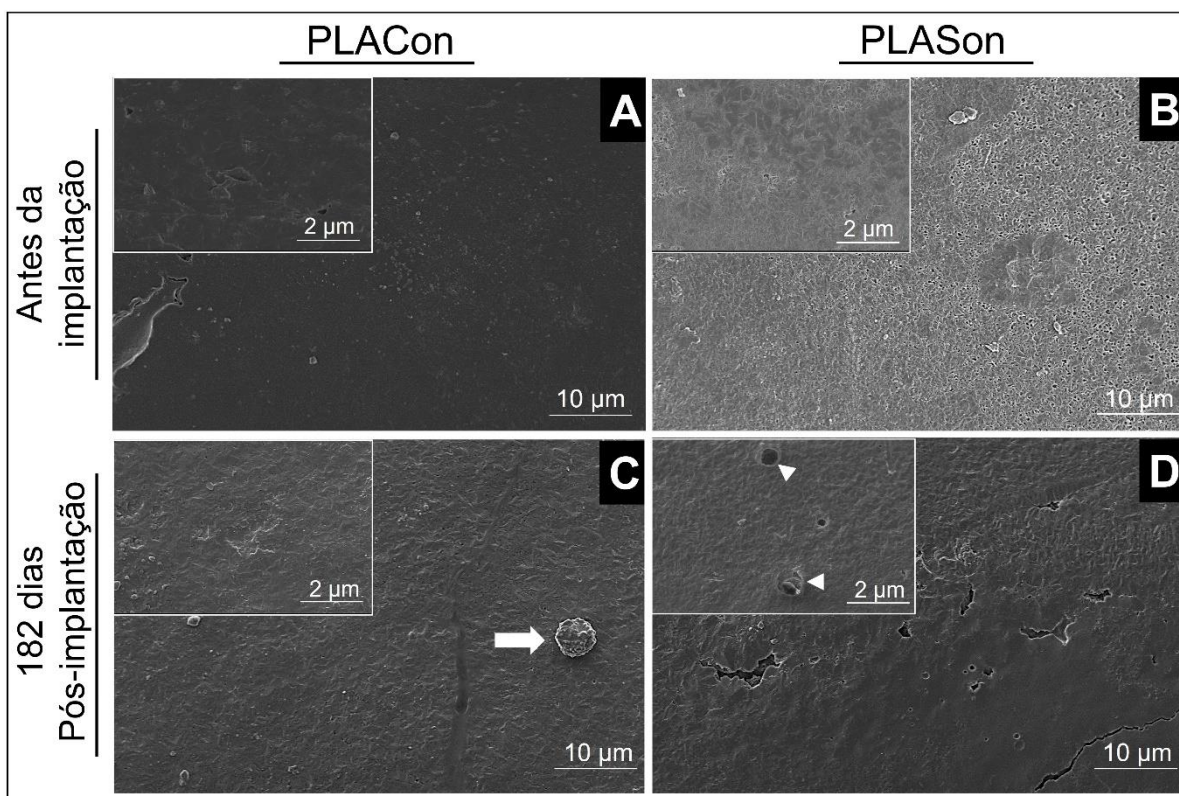


Figura 6. Micrografias eletrônicas de PLACon [poli(ácido láctico + VitE + bacterinas] e PLASon [poli(ácido láctico) + VitE + bacterinas sonicadas] não implantados e 182 dias pós-implantação (DPI). **(A)** e **(B)** antes da implantação (A e B; barra = 20 μm; A e B insete barra = 10 μm). **(C)** artefato circular aderido à superfície do dispositivo PLACon (seta branca) 182 DPI (C; barra = 20 μm; C insete; barra = 10 μm) e **(D)** superfície do dispositivo PLASon 182 DPI. **(D inset)** superfície do PLASon com artefatos aderidos a depressões (cabeça de seta) 182 DPI (C e D; barra = 20 μm; C e D insete barra = 10 μm).

3.3.4 Espectroscopia de Infravermelha com Transformada de Fourier

(FTIR)

As bandas de absorção entre 3500 e 3330 cm^{-1} estão relacionadas às deformações axiais de grupos hidroxila (OH). É possível notar nesse espectro uma deformação nos dispositivos implantados por 126 e 182 dias, sugerindo a formação de ligações de hidrogênio deslocando a banda de absorção e deformação axial de OH para um número de onda mais baixo (Figura 7A). Ainda, as bandas de 2945 cm^{-1} a 2860 cm^{-1} referentes aos grupos metila (CH_2) deformadas principalmente nos materiais implantados estão relacionados a deformações vibracionais presentes em cadeias poliméricas (Figura 7A).

A figura 7B mostra as absorções das bandas (1750 cm^{-1}) de carbonila (C=O) no polímero puro, com adição apenas de vitamina E. Igualmente, o dispositivo PLACon 126 DPI também apresenta esse deslocamento. Já os dispositivos PLASon e PLACon implantados 126 e 182 DPI apresentam deformações axiais para 1650 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} . Em 1450 e 1358 cm^{-1} há absorção dos grupos metila (CH_3), interessante que apenas o dispositivo PLACon implantado por 182 dias apresenta essa deflexão em 1450 cm^{-1} . Dentro desta mesma faixa de absorção, há uma deformação axial (1450 para 1400 cm^{-1}) do PLASon implantado por 126 DPVI.

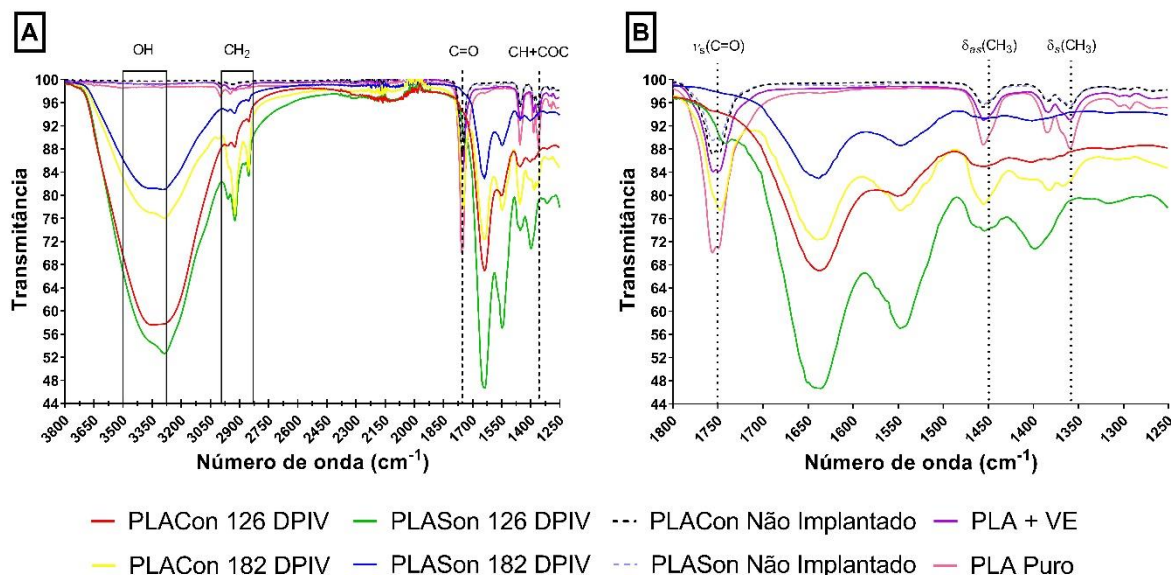


Figura 7. Espectros no infravermelho dos dispositivos de Poli(ácido Lático) (PLA) acrescidos de vitamina E contendo bacterinas ou bacterinas sonificadas (PLACon e PLASon) implantados por 126 e 182 dias ou não, PLA acrescido com vitamina E (PLA + VE) e PLA puro. **(A)** Espectros na faixa de 3800 a 1250 cm^{-1} e **(B)** espectros na faixa de 1800 a 1250 cm^{-1} . As linhas guias sinalizam os grupamentos químicos relacionados às bandas de absorção correspondentes no eixo x.

4. Discussão

Este estudo avaliou a resposta imunológica de tilápias do Nilo implantadas por via intraperitoneal (IP) com dispositivo de PLA como adjuvante incorporado com vitamina E e bacterinas de *Aeromonas Hydrophila* e *Streptococcus Agalataiae*, bem como, avaliou a biocompatibilidade e biodegradação dos dispositivos de PLA após 182 dias pós-implantação. Em estudo recente, Conde et al. [12] comprovaram a biossegurança, biocompatibilidade e biodegradação dos dispositivos de PLA acrescidos ou não com vitamina E implantados em tilápias do Nilo por via IP e subcutânea (SC).

Tendo em vista que o Poli (ácido lático) é extensamente pesquisado como adjuvante vacinal ou transportador de antígenos sob a forma de nanopartículas e micropartículas carreando toxina tetânica [24], toxina diftérica [25], hepatite B [26] e

HIV [27; 28; 29], buscou-se utilizar metodologia diferente em que após a emulsão água/óleo/água produz-se as nano ou micropartículas.

A obtenção de um dispositivo de liberação lenta de antígenos polivalente, ou seja, que alberga dois agentes infecciosos (*Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalatae*) aplicado rapidamente por via IP podendo permanecer no peixe por longo período até total degradação [30] é interessante, no que diz respeito a criação de espécies utilizadas na alimentação humana como a tilápia, observando que estes microrganismos são responsáveis por significativas perdas produtivas [3; 31; 32].

Desse ponto de vista a utilização do dispositivo polimérico se torna ainda mais interessantes pois, a inserção e o próprio dispositivo já inicia a reação inflamatória agindo como adjuvante estimulando a liberação de interleucinas pró-inflamatórias [33], ocorre absorção de proteínas plasmáticas do sangue como albumina e fibrinogênio aumentando o influxo de polimorfonucleares como, neutrófilos, monócitos e macrófagos para o sítio de implantação dois dias após a implantação [34].

A primeira fase da inflamação aguda comumente dura uma semana, entretanto a presença de um corpo estranho faz com que a inflamação aguda persista conduzindo à inflamação crônica [35]. Essa fase (inflamação crônica) permanece por volta de três semanas, marcada pela infiltração de monócitos e ativação de macrófagos que são componentes críticos para a formação da cápsula fibrótica [36]. Reações inflamatórias agudas e crônicas com presença de capsula fibrótica, macrófagos e células gigantes de corpo estranho (CGCE) nos sites de implantação tanto IP como SC foram observados em ratos [23] e em tilápias do Nilo [12].

Os macrófagos nos peixes teleósteos apresentam interações cooperativas com células T e B importantes para produção de anticorpos [37]. Além disso, os macrófagos são responsáveis por outros mecanismos da resposta imune como, fagocitose, degradação de antígenos estranhos, remodelação de tecidos, produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento [38]. Nesse contexto, um importante fator observado nesse estudo foram as CGCE fagocitando partes do dispositivo. O escore de pontuação mais elevado de fagocitose pela presença de CGCE 126 DPI pode estar associado a utilização de vitamina E (VitE) na formulação dos dispositivos corroborando com McNally e Anderson [13] que demonstraram que a VitE acelera a formação de CGCE. Além disso, estas células (CGCE) liberaram entre

a membrana celular e a superfície do biomaterial mediadores de degradação como, espécies reativas de oxigênio (EROs) e enzimas degradativas [33].

Na cápsula fibrótica próximo as CGCE nas implantações PLASon e PLACon pode ser observado células eosinofílicas granulocíticas (CGE) 126 e 182 DPI na forma degranulada ou não, essas células liberam proteínas tóxicas e EROs em áreas inflamadas, ademais, são frequentemente encontradas em inflamações crônicas [39]. Matsuyama e Iida [40] observaram que após inoculação de bactéria *Escherichia coli* na bexiga natatória de tilápias do Nilo provocou degranulação das CGE, sugerindo que estas células liberem mediadores quimiotáticos para neutrófilos.

A liberação de EROs é classicamente conhecida como parte crucial para defesa do hospedeiro na reação inflamatória aguda [41]. No entanto, após a fusão de macrófagos formando as CGCE, há redução na atividade fagocítica, porém, uma capacidade de degradação aumentada [42]. Neste ponto as CGCE secretam prótons e EROs que culminará na reabsorção do biomaterial suscetível a degradação [43]. O incremento na produção de EROs observado nas tilápias implantadas com PLASon e PLACon 68 DPI e a manutenção de elevada produção nos demais períodos pode ser explicada pela presença do dispositivo no site de implantação.

No interior das CGCE foi possível observar melanomacrófagos, geralmente, essas células são encontradas dentro de lesões inflamatórias crônicas [44] e agregadas em áreas denominadas centro de melanomacrófago (CMM) nos tecidos hematopoiéticos como, rim cranial, timo e baço [37].

Os melanomacrófagos ou macrófagos esplênicos sob perspectiva imunológica, transportam materiais fagocitados, incluindo patógenos para CMMs [45], resultando, no acúmulo destes antígenos processados nos CMMs [46]. Em estudo anterior Conde et al. [12] demonstraram que essas células estão presentes na cápsula fibrótica entorno de dispositivos de PLA ou PLA + VitE e agregados (CMMs) no baço durante todo o período de implantação (15 a 120 DPI).

Magor [47] e Saunders et al. [48] sugerem que os CMMs de teleósteos seriam funcionalmente equivalentes de centros germinativos de mamíferos, porém primitivos, envolvidos diretamente na hipermutação somática, seleção de clones de células B, aumento da afinidade de anticorpos culminando na geração de memória imunológica. Entretanto, Zapata [45] descreve que os CMMs não são centros germinativos

primitivos e sim, aglomerados de macrófagos envolvidos na homeostase em condições normais ou patológicas de peixes.

Sob essa ótica, as principais imunoglobulinas (Ig) constituintes da imunidade humoral são, IgM, IgD e IgT produzidas principalmente por plasmoblastos e plasmócitos identificadas no rim cranial e baço, responsáveis pelas respostas de anticorpos de longo prazo em teleósteos importantes para fornecer proteção contra infecções patogênicas [49]. A grande diferença imunológica entre mamíferos e peixes teleósteos como a tilápia do Nilo é a ausência de centros germinativos (CGs). A hipermutação somática de linfócitos B nos CGs refletem a alta proliferação celular, assim, o aumento da afinidade de anticorpos de memória. Em peixes teleósteos a baixa capacidade de divisão (hipermutação) dos linfócitos B resulta em número menor de anticorpos de alta afinidade, cerca de 100 vezes menos que em mamíferos [45; 50; 51].

Nesse campo, adjuvantes têm sido amplamente pesquisados na composição de vacinas no intuito de melhorar a eficácia incrementando a potência e longevidade de respostas imunes específicas para antígenos [52] e reduzindo o número de doses de reforços ou a quantidade de antígeno por dose [53]. Dentro da pesquisa e utilização de biopolímeros como adjuvantes, nosso estudo demonstrou que os dispositivos de PLA formulado com VitE e bacterinas sonicadas (PLASon) e intacta (PLACon) incrementam a resposta imunológica ao longo do tempo. Cabe ressaltar que, o grupo PLASon apresentou titulação de IgM superiores 28 e 182 DPI. Ainda, esses resultados foram estatisticamente melhores que o padrão durante todo o período experimental.

Bahera et al. [54] utilizando Poli(ácido D,L-lático-co-glicólico) como adjuvante (micropartículas) na preparação de vacina para *Aeromonas Hydrophila* (Ah) em carpas indianas (*Labeo rohita*) apresentou titulações de IgM superiores ao controle 21 e 42 dias pós inoculação. Outros estudos imunológicos com tilápias do Nilo [55] e pacus (*Piaractus mesopotamicos*) [56] em formulações vacinais para *Streptococcus agalactae* (Sta) e Ah, respectivamente, utilizando adjuvantes comerciais, comprovam o aumento da titulação de IgM durante 14 dias para Sta e 84 dias pós-inoculação para Ah.

Os períodos avaliados comprovam apenas que há aumento na IgM pós inoculação, entretanto, não comprovam a eficácia durante o período de criação de

peixes. Em contrapartida Wangkaghart et al. [9] utilizando Sta e Aly et al. [57] utilizando Ah em adjuvantes comerciais comprovam a longevidade nas titulações por 8 semanas (1,8 meses) e 10 semanas (2,3 meses) respectivamente. Diferentemente dos estudos apresentados em que as vacinas propostas são para um único agente infeccioso, o dispositivo vacinal polivalente (*Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*) PLASon testado neste estudo, comprova a eficácia na longevidade de IgM por 26 semanas (182 DPI) quando comparado a composição vacinal polivalente com adjuvante comercial e ao controle, sugerindo que nossa formulação consiga imunizar tilápias do Nilo durante todo o período de criação.

Na preparação vacinal os adjuvantes são substâncias auxiliares utilizadas para aumentar a amplitude (potência) a uma resposta adaptativa frente a agente infeccioso e/ou eficácia na capacidade de prevenir uma infecção. Além disso, os adjuvantes estruturalmente heterogêneos podem orientar e modular a imunogenicidade da resposta adaptativa específica a um ou mais antígenos [6]. Diante do exposto anteriormente sobre os efeitos imunológicos induzidos pela implantação e permanência de dispositivos polímeros *in situ*, fica evidente o enorme potencial de sua utilização para imunização como sistemas de entrega de antígenos [58].

Durante o processo de biodegradação e bioabsorção mais lenta do PLA a liberação dos antígenos é constante [30; 59]. Essa liberação foi mais efetiva no dispositivo PLASon tendo em vista a produção de IgM superior ao controle. A redução de peso do observada após 182 DPI apoia essa afirmação, pois a despolimerização por hidrólise das extremidades da cadeia polimérica causa essa perda de peso [60].

A análise por FTIR demonstrou que somente a mistura de VitE ou a inclusão de VitE mais bacterinas ou bacterinas sonicadas não alterou as faixas de absorção dos dispositivos não implantados. A deformação axial dos dispositivos implantados (PLASon e PLACon) em 3470 até 3330 cm^{-1} podem estar relacionados a ligações de hidrogênio deslocando a banda de absorção de OH para baixo [61]. A deformação axial simétrica e assimétrica de grupos metila (CH_2) nas bandas de 2945 até 2860 cm^{-1} estão associados as deformações vibracionais normalmente observadas nas cadeias poliméricas [62]. Os dispositivos não implantados mostram um leve deslocamento, o PLA deslocamento normal, enquanto os dispositivos implantados apresentam redução na transmitância, sugerindo efeito da implantação nesse

grupamento. Os dispositivos não implantados mostraram deformação axial na banda 1746 até 1735 cm^{-1} de absorção da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) que compõe o caráter hidrofílico ao PLA [63], diferentemente PLACon implantado por 182 DPI também apresentou o mesmo comportamento.

O deslocamento da banda de absorção da carbonila (1746 até 1735 cm^{-1}) para 1635 e 1550 cm^{-1} apresentados pelos dispositivos implantados 126 e 182 DPI sugerem absorção de água [64]. No entanto, Leroy et al. [65] utilizando malhas de PLLA implantadas no subcutâneo de coelhos mapeou a banda em 1646 cm^{-1} e observou que após 4 semanas de implantação há deposição de matriz extracelular. Os biomateriais não implantados e somente PLACon (182 DPI) apresentam deformações axiais nas bandas 1452 e 1360 cm^{-1} relativas ao grupamento metila (CH_3) qualificando os dispositivos como hidrofílicos [63; 66]. O PLA misturado a outros compostos como quitosana e quitina reduzem a transmitância nessas faixas (1452 e 1360 cm^{-1}) diminuindo a hidrofobicidade [66]. Assim, a permanência do PLACon (182 DPI) em 1452 cm^{-1} e o deslocamento do PLASon (126 DPI) dentro dessas bandas podem sugerir a diferença na perda de peso dos dispositivos.

A morfologia dos biomateriais observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) auxilia na compreensão das reações teciduais (biocompatibilidade) e biodegradação dos materiais implantados [67; 68]. A observação de poros e fraturas na superfície do material implantados por via intraperitoneal (IP) em ratos sugere reação tecidual pronunciada culminando em biodegradação [23]. Outro estudo [69] relata que a implantação IP pode causar biodegradação mais intensa devido ao fluido peritoneal.

Renò et al. [14] incorporaram VitE ao PLA utilizando clorofórmio, reportaram que a morfologia superficial dos discos produzidos (1 cm^2) foi drasticamente alterada, resultando em muito poros. Diferentemente, nossos dispositivos não apresentaram esta característica. Após implantação de 182 dias os dispositivos PLASon apresentaram mais fraturas na superfície do que PLACon, sugerindo maior biodegradação. Além disso, as imagens de MEV (182 DPI) revelaram artefatos aderidos ao dispositivo vacinal. Imagens semelhantes foram reportadas por Schoubert et al. [70] demonstrando a aderência de macrófagos na superfície do biomaterial estudado. A observação em menor proporção de fraturas sugerindo biodegradação

pode estar associado a espécie do hospedeiro (tilápias do Nilo), forma, alteração na composição química (PLA+VitE), rugosidade, porosidade, morfologia e duração do contato [71; 72].

Por fim, o presente estudo apresenta uma lacuna na avaliação da efetividade do dispositivo vacinal por meio de desafio de coabitação utilizando os agentes patogênicos em questão *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*. Este método simula surtos de doenças naturais em que a infecção é introduzida por alguns indivíduos infectados. Assim, um caso índice como uma fonte primária de infecção introduzido em uma população suscetível, permite a progressão sequencial da infecção utilizando “portas de entrada” dos patógenos na superfície da mucosa para o estabelecimento de patologia, progredindo para órgãos-alvo. Esta metodologia pode ser útil na identificação dos mecanismos de imunidade protetora tanto na superfície da mucosa quanto no ambiente sistêmico [73].

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 *Streptococcus 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 potentially 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 pacu, *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] Veisesh 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] Herraiez MP, Zapata AG. Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius 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, Arijó 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, Vodsed'álková 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.