

## EFEITO DA LEVEDURA *Pichia pastoris* X-33 PRODUZIDA EM EFLUENTE DE ARROZ PARBOILIZADO SUPLEMENTADO COM GLICEROL DE BIODIESEL NA IMUNOMODULAÇÃO DE FRANGOS VACINADOS CONTRA A DOENÇA DE MAREK

EMILI GRIEP<sup>1</sup>; GIANA GABOARDI<sup>1</sup>; SAMANTHA VARGAS<sup>1</sup>; LUIZA FERNANDES<sup>2</sup>; DIEGO GIL DE LOS SANTOS<sup>3</sup>; FABRICIO R. CONCEIÇÃO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – emiliigriep@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal do ABC - fernandessluiza@gmail.com

<sup>3</sup>Instituto Federal Sul-rio-grandense, Campus Pelotas - diegogil@pelotas.ifsul.edu.br

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - fabricio.rochedo@ufpel.edu.br (orientador)

### 1. INTRODUÇÃO

O termo “probiótico” é utilizado para micro-organismos que conferem benefícios à saúde, quando administrados em dose suficiente (REID et al., 2003). Probióticos podem interagir com o hospedeiro, através de estímulo e modulação do sistema imune da mucosa. Em medicina veterinária, os probióticos possuem aplicação como promotores de crescimento, caracterizando-se como uma alternativa aos antibióticos, cujo uso indiscriminado pode selecionar micro-organismos patogênicos resistentes. Também é uma estratégia para aumentar a resposta imune de animais vacinados ou infectados por vírus ou bactérias (DEL CENSE SERIE et al., 2008). Os benefícios dos probióticos em frangos foram observados quanto ao desempenho e à saúde, com melhora na resistência a infecções por *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* (LA RAGIONE & WOODWARD, 2003; GIL DE LOS SANTOS et al., 2012). Porém, referências acerca da resposta imune induzida por leveduras probióticas em frangos ainda são escassas.

A Doença de Marek (DM) é uma doença neoplásica e linfoproliferativa, bastante comum e de grande impacto econômico, que acomete galinhas (SINGH et al., 2012) e é causada pelo herpes vírus MDV (“Marek Virus Disease”). Além de atacar tecidos linfoïdes, resultados sugerem que o vírus pode causar disbiose, afetando a microbiota intestinal (PERUMBakkam et al., 2014). Nestas situações, a adição de probióticos na alimentação pode minimizar o desequilíbrio da microbiota e diminuir os riscos de infecções por patógenos.

A levedura *Pichia pastoris* cepa KM71H foi utilizada em estudos recentes em frangos e possui propriedades probióticas (GIL DE LOS SANTOS et al., 2012). Além disso, produz alta concentração de massa celular quando utiliza o glicerol como fonte de carbono, metabolizando-o rapidamente (HIGGINGS e CREGG, 1998). Diversas pesquisas têm buscado meios alternativos para o cultivo de leveduras. Cepas de *Pichia* já foram cultivadas em subproduto da indústria de biodiesel contendo glicerol (ÇELIK et al., 2008), e em efluente de arroz parboilizado adicionado de glicerol (GIL DE LOS SANTOS, 2012).

O objetivo do estudo foi avaliar por ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) o efeito da levedura *P. pastoris* cepa X-33 produzida em efluente de arroz parboilizado acrescido de glicerol de biodiesel, na imunomodulação de frangos de corte vacinados contra a DM.

### 2. METODOLOGIA

Frangos de corte com um dia de idade, vacinados contra DM foram divididos em 4 grupos de 30 aves. Os grupos foram divididos de acordo com o tratamento a

ser recebido na ração: 1) controle – ração não suplementada; 2) ração suplementada com  $1 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> de *Saccharomyces boulardii*; 3) ração suplementada com  $1 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> de *Pichia pastoris* X-33, cultivada em efluente de parboilização de arroz adicionado de 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, subproduto da indústria de biodiesel; 4) ração suplementada com  $1 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> de *P. pastoris* X-33, cultivada em YPD. Nos dias 14, 28 e 42 foram coletadas amostras de sangue de cada um dos animais.

Os soros dos animais foram testados por ELISA indireto utilizando como antígeno para a sensibilização das placas, a vacina comercial para a DM. Após padronização, estabeleceu-se a utilização de 1 dose de vacina por cavidade como antígeno e para o soro diluições de 1:200 a 1:1600. Como controle negativo foi utilizado o soro de 3 animais SPF (“Specific Pathogen Free”), e como controle positivo foi utilizado o soro de um animal infectado pelo vírus da DM, ambos na diluição 1:200. Os soros foram preparados em pool de 3 animais de mesmo grupo, escolhidos aleatoriamente. Assim, do total de 120 animais, separados em 4 grupos de 30, foram obtidos 10 pools por grupo.

Placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 100 µL por cavidade do antígeno diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6), e incubadas por 16 h a 4 °C. Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas com 5% de leite em pó, por 1 h a 37°C. Os soros foram diluídos de 1:200 a 1:1600 e adicionados às cavidades da placa em duplicata (100 µL/cavidade) e incubados por 1 h a 37°C. Em seguida, o anticorpo conjugado com peroxidase anti-IgY foi adicionado e a placa incubada por 1 h a 37°C. Após cada etapa, as placas foram lavadas 3 vezes, com 200 µL de PBS-T por cavidade. A reação foi revelada pela adição de 100 µL/cavidade da solução cromógena OPD diluída em tampão fosfato-citrato pH 4,0 (0,2 M com 0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A placa foi mantida por 15 min no escuro a temperatura ambiente e a leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro para microplacas com filtro de 450 nm. O título de anticorpos foi expresso como a última diluição que apresentou DO<sub>450</sub> média maior ou igual à obtida pelos controles negativos + 2 desvios padrão.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 28 dias observou-se a queda nos títulos de anticorpos anti-DM em todos os grupos testados. Aos 42 dias, o grupo tratado com *P. pastoris* X-33 cultivada em efluente apresentou altos títulos de anticorpos anti-DM, semelhante ao observado no grupo tratado com *S. boulardii*. O grupo que apresentou a menor titulação foi o tratado com *P. pastoris* X-33 cultivada em meio YPD (Figura 1).

O comportamento da curva de títulos de anticorpos anti-DM, ao longo do experimento, se assemelha aos resultados obtidos por GIL DE LOS SANTOS (2012), no qual aves vacinadas contra Doença Infecciosa da Bursa (DIB), que receberam os mesmos tratamentos do nosso estudo, tiveram queda no título de anticorpos anti-DIB após 28 dias. O decréscimo nesse período pode ter ocorrido pela diminuição de anticorpos adquiridos da mãe, por imunidade passiva, o que está de acordo com o descrito por KNOBLICH et al. (2000), quando relataram não serem detectáveis por ELISA os anticorpos anti-DIB aos 28 dias após a vacinação de pintos contra DIB e DM.

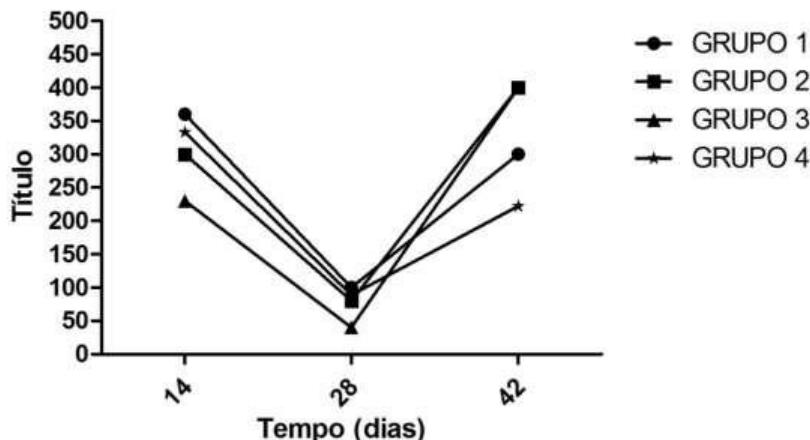


Figura 1. Determinação por ELISA indireto dos títulos de anticorpos anti-DM nos grupos testados, em função do tempo. G1: Controle; G2: *S. boulardii*; G3: *P. pastoris* X-33 cultivada em efluente; G4: *P. pastoris* X-33 cultivada em YPD.

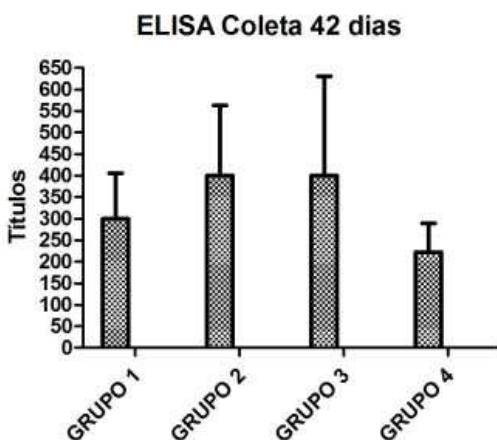


Figura 2. Determinação por ELISA indireto dos títulos de anticorpos anti-DM nos grupos testados, aos 42 dias de experimento. G1: Controle; G2: *S. boulardii*; G3: *P. pastoris* X-33 cultivada em efluente; G4: *P. pastoris* X-33 cultivada em YPD.

Após 42 dias, o grupo que recebeu *P. pastoris* X-33 cultivada no efluente teve o mesmo título de anticorpos que o grupo suplementado com *S. boulardii*, uma levedura já consolidada como probiótico no mercado (Figura 2). Do ponto de vista econômico, estes resultados são interessantes, pela possibilidade de utilizar um subproduto da agroindústria, sem valor agregado, como meio de cultivo para a produção de leveduras probióticas, diminuindo o custo para o avicultor. GAO et al. (2008) relataram o aumento dos títulos de anticorpos anti-NDV (Vírus da Doença de Newcastle, do inglês), através da suplementação com cultura de leveduras (YC) para frangos, sugerindo a atuação do probiótico como um adjuvante da vacina.

#### 4. CONCLUSÕES

A adição da levedura *Pichia pastoris* X-33, produzida em efluente de arroz parboilizado, na dieta de frangos de corte vacinados contra a Doença de Marek (DM) promoveu o aumento no título de anticorpos anti-DM após 42 dias de suplementação. Neste período, o grupo suplementado com *P. pastoris* X-33 produzida em efluente teve o mesmo título de anticorpos que o grupo suplementado com probiótico comercial.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÇELIK, E.; OZBAY, N.; OKTAR, N.; ÇALIK, P. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 9, p. 2985 – 2990, 2008.
- DELCENSERIE, V.; MARTEL, D.; LAMOUREUX, M.; AMIOT, J.; BOUTIN, Y.; ROY, D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 10, n. 1-2, p. 37-54, 2008.
- GAO, J.; ZHANG, H.J.; YU, S.H.; WU, S.G.; YOON, I.; QUIGLEY, J.; GAO, Y.P.; QI, G.H. Effects of Yeast Culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. **Poultry Science**, v. 87, n. 7, p. 1377–1384, 2008.
- GIL DE LOS SANTOS, D. **Cultivo de *Pichia pastoris* X33 em efluentes industriais e suas aplicações**. 2012. 85 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.
- GIL DE LOS SANTOS, J. R.; STORCH, O. B.; FERNANDES, C. G.; GIL-TURNES, C. Evaluation in broilers of the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *Pichia pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 3-4, p. 448–451, 2012.
- HIGGINGS, D.R.; CREGG, M. **Methods in molecular Biology – *Pichia* Protocols**, Humana Press Inc, USA, 1998.
- KNOBLICH, H.V.; SOMMER, S.E.; JACKWOOD, D.J. Antibody titers to infectious bursal disease virus in broiler chicks after vaccination at one day of age with infectious bursal disease virus and Marek's disease virus. **Avian Diseases**, v. 44, n. 4, p. 874-884, 2000.
- LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 245-256, 2003.
- PERUMBakkam, S.; HUNT, H.D.; CHENG, H.H. Marek's disease virus influences the core gut microbiome of the chicken during the early and late phases of viral replication. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 90, p. 300-312, 2014.
- REID, G.; JASS, J.; SEBULSKY, M.T.; MCCORMICK, J.K. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. **Clin. Microb. Rev.**, v. 16, n. 4, p. 658–672, 2003.
- SINGH, S.D.; BARATHIDASN, R.; KUMAR, A.; DEB, R.; VERMA, A.K; DHAMA, K. Recent Trends in Diagnosis and Control of Marek's Disease (MD) in Poultry. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Paquistão, v.15, n.20, p.964-970, 2012.