

## AVALIAÇÃO DE *Pichia pastoris* X-33 PRODUZIDA EM EFLUENTES INDUSTRIALIS NA IMUNOMODULAÇÃO DE CODORNAS VACINADAS CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE

EMILI GRIEP<sup>1</sup>; GIANA GABOARDI<sup>1</sup>; JÚLIA CASTRO<sup>2</sup>; DYÉLLEN VASCONCELOS<sup>2</sup>; DIEGO GIL DE LOS SANTOS<sup>3</sup>; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPel

<sup>2</sup>Faculdade de Agronomia, Departamento de Zootecnia, UFPel

<sup>3</sup>Instituto Federal Sul-rio-grandense, Campus Pelotas

*emiliigrip@gmail.com*

*fabricio.rochedo@ufpel.edu.br*

### 1. INTRODUÇÃO

A coturnicultura é um ramo da avicultura que tem apresentado desenvolvimento bastante acentuado no Brasil, que está passando a ocupar um cenário de atividade altamente qualificada com resultados promissores aos investidores. Diversos fatores motivam a criação de codornas, como o rápido crescimento, a precocidade na produção e maturidade sexual (35 a 42 dias), a alta produtividade (média de 300 ovos/ano), persistência na produção de ovos, pequenos espaços para grandes populações, o baixo investimento e, consequentemente, o rápido retorno financeiro (PASTORE, OLIVEIRA & MUNIZ, 2012). Várias doenças podem influenciar negativamente a coturnicultura. Dentre elas, a doença de Newcastle (VDN) é uma enfermidade viral transmitida por aerossóis que pode acometer diversas aves comerciais ou silvestres, sendo de notificação obrigatória no Brasil (ADAPI).

O uso de probióticos vem se destacando na avicultura, devido ao fato de proporcionar benefícios como aumento do ganho de peso, resistência a doenças e modulação do sistema imune (GIL DE LOS SANTOS & GIL-TURNES, 2005). *Pichia pastoris* é uma levedura amplamente utilizada na expressão heteróloga de proteínas e nos últimos anos vem sendo caracterizada como probiótico em camundongos e frangos (FRANÇA et al., 2015; GIL DE LOS SANTOS et al., 2012). Porém, não existe nenhum estudo na literatura indicando o potencial probiótico de *Pichia pastoris* X-33 em codornas.

GIL DE LOS SANTOS (2012) demonstrou que *Pichia pastoris* X-33, quando adicionada na alimentação de frangos, possibilitou o aumento de peso em 42 dias, além de melhorar a imunomodulação das aves vacinadas contra a Doença Infecciosa da Bursa (DIB). Em um trabalho anterior, o mesmo autor demonstrou que a levedura *P. pastoris* X33 pode ser cultivada em efluente de arroz parboilizado suplementado com glicerol de biodiesel, em biorreator, com elevada produção de biomassa e viabilidade celular e diminuição da demanda química de oxigênio e remoção de nitrogênio e fósforo (GIL DE LOS SANTOS et al., 2012a). Estes resultados demonstraram a possibilidade de produzir a levedura a um baixo custo e adicionalmente, promover a redução do impacto ambiental deste efluente.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de *Pichia pastoris* X-33 produzida em resíduos industriais na modulação da resposta imune de codornas vacinadas contra a Doença de Newcastle.

## 2. METODOLOGIA

A levedura *Pichia pastoris* X-33 foi cultivada em dois meios de cultivo, um deles comercial e o outro composto por efluente de arroz parboilizado suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol de biodiesel. Foram utilizadas 106 codornas fêmeas, da linhagem *Coturnix coturnix coturnix*, alojadas em duplas, sendo cada dupla considerada uma unidade experimental. As aves foram divididas em 4 tratamentos: T1 – dieta basal sem adição da levedura; T2 – dieta basal + *P. pastoris* produzida em efluente de arroz parboilizado + glicerol de biodiesel; T3 – dieta basal + *Pichia pastoris* produzida em meio comercial; T4 – Animais controle, não vacinados, que receberam dieta basal sem adição da levedura. *Pichia pastoris* foi fornecida junto à ração na concentração de 1 x 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de ração. O experimento teve a duração de 84 dias. Com 40 dias de idade, todas as aves, exceto o grupo controle, foram vacinadas com a vacina New-Vacin La Sota, contra a doença de Newcastle. Em cada ave foi aplicada uma dose de 0,25 mL por via intramuscular, no músculo do peito. Após 28 dias da vacinação, as aves foram revacinadas, com a mesma dose anterior.

Nos dias 14, 28, 56 e 84, foram coletadas amostras de sangue dos animais para utilização dos soros nos testes de imunomodulação. Para realização dos testes, os soros foram testados frente à vacina utilizada. Os anticorpos IgY foram quantificados por ELISA. Sensibilizou-se placas de 96 cavidades com duas doses da vacina por poço, *overnight* a 4 °C. Após, realizou-se o bloqueio com solução de leite em pó a 5% e então foram adicionados os soros na diluição de 1:50 em PBS-T. Como antícorpo secundário foi utilizado anti-IgY de galinha (Bio-Rad) na diluição de 1:2000 e após, foi feita a revelação com solução reveladora (OPD + Tampão fosfato-citrato + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Entre todas as etapas após a sensibilização, as placas foram incubadas a 37 °C por 1 hora e lavadas com PBS-T.

O ensaio de inibição da hemaglutinação foi realizado para a titulação dos anticorpos anti-VDN. Para o teste com VDN, é necessário 4 unidades hemaglutinantes (UHA) do vírus. Em placas de 96 cavidades de fundo V, distribuiu-se 25 µL de diluente (PBS) por cavidade. Em seguida, aplicou-se 25 µL do antígeno (vacina New-Vacin La Sota) na primeira cavidade com diluente e misturou-se até obter-se uma diluição 1:2. Fez-se diluições subsequentes até 1:4096, na base 2 e em cada cavidade com o antígeno previamente diluído, adicionou-se 25 µL de uma suspensão de hemácias de galinha, lavadas e diluídas a 1%. Após agitação branda, para a homogeneização entre o antígeno e as hemácias, a microplaca foi deixada em repouso até sedimentação completa das hemácias da linha de controle, formando um botão. O título foi a recíproca da diluição mais alta onde houve aglutinação completa, correspondendo a 1 UHA. A inibição da hemaglutinação (IHA) também foi conduzida em placas de 96 cavidades de fundo V. Distribuiu-se 25 µL de diluente (PBS) por cavidade. Em seguida, colocou-se 25 µL dos soros das aves na primeira cavidade com diluente (A1 – H1) e misturou-se, obtendo uma diluição inicial de 1:2. Após, foram realizadas diluições subsequentes, até 1:4096. Distribuiu-se 25 µL do antígeno contendo 4 UHA nas cavidades com os soros diluídos. Após, foi realizada a incubação das microplacas por 20-30 minutos em temperatura ambiente. Aumentou-se então 25 µL de uma suspensão de hemácias de galinha a 1%. A leitura foi realizada assim que as hemácias da linha controle apresentaram completa sedimentação, com a formação de botão. O controle das hemácias foi feito em uma linha da microplaca, que continha PBS e 25 µL da suspensão de hemácias a 1%. Para que o teste de IHA fosse considerado válido, realizou-se a retrotitulação do antígeno, distribuindo-se 25 µL de PBS em uma linha da

microplaca e 25 µL da suspensão de antígeno, contendo 4 UHA na primeira cavidade. Fez-se diluições sucessivas até o final da linha, sendo esperado aglutinação na primeira (2 UHA) e na segunda (1 UHA) cavidades e formação do botão de hemácias nas demais.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 pode-se observar que os animais suplementados com *Pichia pastoris* produzida em efluente da parboilização do arroz e em meio YPD tiveram títulos de anticorpos anti-VDN maiores que os grupos controle e não vacinados, 84 dias após a vacinação.

Tabela 1. Título de anticorpos anti-VDN de codornas de corte alimentadas com dietas contendo *P. pastoris* produzida em efluente da parboilização do arroz ou em meio YPD.

Dias pós-vacinação	Controle	<i>P. pastoris</i> em Efluente	<i>P. pastoris</i> em YPD	Não-vacinados
14d	10	7	6,5	0
28d	4,5	13	9	2
56d	32	20	30	2
84d	20	84*	240*	8

\* (p<0,05) em relação ao controle.

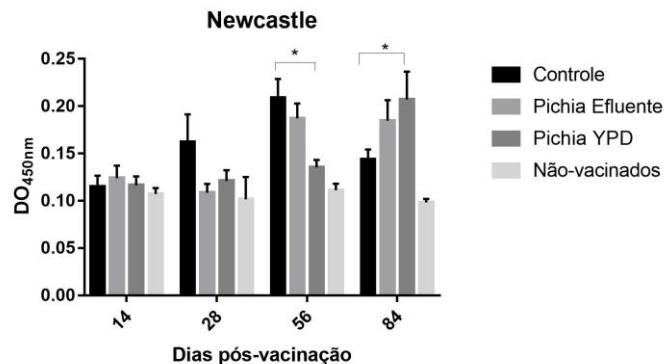


Figura 1. Resposta imune humoral anti-VDN de codornas de corte alimentadas com dietas contendo *P. pastoris* produzida em efluente da parboilização do arroz ou em meio YPD. \*(p<0,05).

Os resultados observados na Tabela 1 reforçam dados já descritos na literatura sobre o efeito de probióticos sobre a imunidade humoral de codornas. Em 2012, Kasmani e colaboradores relataram que a suplementação da dieta de codornas com o bacilo *Berevibacillus laterosporus* (*Bl*) promoveu o aumento significativo do título de anticorpos anti-VDN em relação ao grupo controle.

Na Figura 1, estão demonstrados os resultados da quantificação de anticorpos anti-VDN obtidos por ELISA indireto. Aos 84 dias, o grupo que recebeu suplementação com *Pichia pastoris* cultivada em YPD teve resposta imune humoral maior que o grupo controle. A levedura *Pichia pastoris* já vem sendo caracterizada como probiótico em frangos, agindo como agente imunomodulador (GIL DE LOS SANTOS, 2012; GIL DE LOS SANTOS et al., 2012). No presente trabalho, sua influência sobre a resposta imune de codornas foi mais acentuado aos 84 dias,

aumentando de 4 a 10 vezes o título anti-VDN, em relação ao grupo controle, quando cultivada em efluente ou em YPD, respectivamente (Tabela 1). Estes resultados se destacam em relação aos obtidos com codornas alimentadas com ração contendo um consórcio de probióticos já estabelecidos comercialmente, que mostraram que o grupo suplementado com os probióticos comerciais tiveram o dobro do título do grupo controle (KASMANI & MEHRI, 2015). Esta comparação reforça o potencial do uso de *P. pastoris* como probiótico para produção avícola.

#### 4. CONCLUSÕES

Neste estudo, concluiu-se que a suplementação com *Pichia pastoris* X-33 melhorou a imunomodulação de codornas vacinadas contra a Doença de Newcastle.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência de Defesa Agropecuária do Piauí (ADAPI). **Sanidade avícola: Doença de Newcastle.** Disponível em <http://www.adapi.pi.gov.br>. Acesso em: 13 de outubro de 2017.

FRANÇA, R.C.; CONCEIÇÃO, F.R.; MENDONÇA, M.; HALBERT, L.; SABADIN, G.; DIAZ DE OLIVEIRA, P.; AMARAL, M.G.; SILVA, W.P.; MOREIRA, A.N. *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella Typhimurium*. **Appl Microbiology and Biotechnology.** DOI 10.1007/s00253-015-6696-9. 2015.

GIL DE LOS SANTOS, Diego. **Cultivo de *Pichia pastoris* X33 em efluentes industriais e suas aplicações.** 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

GIL DE LOS SANTOS, J.R.; GIL-TURNES, C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural.** v.35, nº 3, p.741-747, 2005.

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 *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. **Veterinary Microbiology.** 156(3–4): 448451, 2012.

GIL DE LOS SANTOS, D., GIL-TURNES, C., CONCEIÇÃO, F.R. Bioremediation of parboiled rice effluent supplemented with biodiesel-derived glycerol using *Pichia pastoris* X-33. **The Scientific World Journal.** doi:10.1100/2012/492925. 2012a.

KASMANI, B. F.; KARIMI, T.; ALLAMEH, A.; SHARIATMADARI, F. A novel aflatoxin-binding *Bacillus* probiotic: Performance, serum biochemistry, and immunological parameters in Japanese quail. **Poultry Science.** 91 :1846–1853, doi.org/10.3382/ps.2011-01830, 2012.

KASMANI, F.B.; MEHRI, M. Effects of a multi-strain probiotics against aflatoxicosis in growing Japanese quails. **Livestock Science.** 177 (110-116), 2015.

PASTORE, S.M.; OLIVEIRA, W.P.; MUNIZ, J.C.L. Panorama da coturnicultura no Brasil. **Revista eletrônica Nutritime.** v.9, nº 6, p. 2041-2049, 2012.