

## Efeito da suplementação com farinha de *black soldier fly* na resposta imune humoral adaptativa de camundongos BALB/c

MIGUEL ANDRADE BILHALVA; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES; MARCOS ROBERTO A. FERREIRA; RAFAEL DA SILVA GONÇALVES; SANDRO DANIEL NORBERG; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO

Universidade Federal de Pelotas – miguel.bilhalva@ufpel.edu.br

Universidade Federal de Pelotas – marcosferreiravet@gmail.com

Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), estimasse que a população mundial pode chegar a 8,5 bilhões de pessoas em 2030 e 9,6 bilhões em 2050 (ONU, 2022), tal crescimento está acompanhado da crescente demanda por proteína animal, forçando o constante crescimento do setor pecuário, no entanto, este crescimento deve ocorrer de forma sustentável, visando controlar o impacto ambiental do setor e não simplesmente aumentar a escala de produção.

Visando uma abordagem de economia circular, a utilização de farinha de larva de insetos vem ganhando força nos últimos anos como fonte alternativa de proteínas na alimentação e/ou suplementação alimentar de animais de produção (HEUEL et al, 2021). Esta fonte sustentável de aminoácidos essenciais chama a atenção de pesquisadores e produtores, sendo considerada um substituto em potencial para a farinha de peixe e farinha de soja na ração de aves, peixes e mamíferos (HEUEL et al, 2021; CHEMELLO et al, 2020; LI et al, 2019).

Neste contexto, a farinha da larva da mosca *black soldier* (BSFL) é uma das mais relatadas para a suplementação na dieta animal. Para a produção de BSFL podem ser utilizados diferentes substratos orgânicos como dejetos animais, miudezas de peixes, resíduos agrícolas entre outros, por consequência, a produção de BSFL apresenta um custo ambiental e econômico inferior ao da produção de proteínas convencionais (SALOMONE et al, 2016). Além de sua viabilidade de produção e preservação ambiental, acredita-se que esta fonte de proteínas não afeta negativamente a digestibilidade de nutrientes, desempenho zootécnico ou a morfologia intestinal dos animais, além de não impactar negativamente a qualidade da carne ou outros produtos derivados destes animais (HEUEL et al, 2021; GARIGLIO, 2021; BIASATO et al, 2016).

No entanto, efeitos relacionados a imunidade adaptativa dos animais que consomem esta dieta são pouco relatados, abrindo espaço para investigações que apontem prováveis benefícios ou prejuízos ao sistema imune dos animais alimentados com BSFL. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o impacto da suplementação de BSFL (10%) na dieta de camundongos BALB/c vacinados com uma vacina recombinante trivalente. O parâmetro utilizado foi a resposta imune humoral adaptativa, quantificada através de um ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IgG específica no soro dos animais vacinados.

### 2. METODOLOGIA

Para este experimento, foram utilizados 20 camundongos linhagem BALB/c, fêmeas, de 4 a 6 semanas de idade e condições corporais homogêneas. Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos (G1 e G2), G1: 10 animais

com suplementação de 10% de BFSL na dieta, começando uma semana antes da primeira dose de vacina; G2: 10 animais sem suplementação alimentar.

A vacina foi administrada por via subcutânea em duas doses, nos dias 0 e 14. Os 20 animais foram inoculados com a mesma formulação, contendo o antígeno recombinante trivalente (50 µg) adsorvido em Al(OH)<sub>3</sub>. As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0 e 25, logo após a última coleta os animais foram eutanasiados.

O ELISA foi realizado em microplacas de poliestireno (Nunc). As placas foram sensibilizadas com os três antígenos-alvo, separados, tais quais a vacina oferece proteção (A, B e C). Os ensaios foram realizados em volume de trabalho de 100 µl/poço e lavagens entre cada etapa com PBS-T.

As placas foram sensibilizadas com 200 ng de cada antígeno diluídos em tampão carbonato-bicarbonato e incubadas (4 °C *overnight*). No dia seguinte, as placas foram lavadas e posteriormente aplicados os soros diluídos 1:100 em PBS-T e incubados (37 °C, 1 hora). Em seguida, as placas foram lavadas e então acrescentado o conjugado diluído 1:5000 (anti-mouse-IgT conjugado a peroxidase) em PBS-T e incubado (37 °C, 1 hora), após a incubação do conjugado as placas foram lavadas pela última vez. Para a revelação, foi utilizada solução de revelação com ortofenilenodiamina (OPD) em tampão citrato-fosfato (0,2 M, pH 4,0 e 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) incubada 15 minutos a temperatura ambiente. Após 15 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de solução de parada (ácido sulfúrico 3%).

Foram utilizados pools do dia 0 e amostras individuais do dia 25 dos animais de todos os grupos e um controle positivo por placa.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar da variação entre as absorbâncias individuais demonstradas na Figura 1 (A, B e C), quando observados os resultados através de uma análise estatística podemos apontar que não existe diferença significativa entre as respostas humorais dos dois grupos, independente do antígeno.

Esta é a primeira vez que se avalia a resposta imune humoral adaptativa de camundongos suplementados com BSFL, no entanto, BSFL já foi avaliada quanto suas capacidades imunomoduladoras anteriormente em outras espécies. Em frangos, estudos recentes apontaram que uma suplementação de 10% de BSFL provocou maior produção de ocitocinas e proliferação de linfócitos T CD8 após infecção induzida (ZHANG et al, 2021), ainda em aves observou-se que uma suplementação mais discreta de BSFL (2 e 3%) provavelmente reforçou o sistema imune inato de pintos, apresentando efeito profilático que conferiu maior resistência a infecção por *Salmonella Gallinarum* aos animais suplementados (LEE et al, 2018).

Boa parte dos estudos sobre imunomodulação com BSFL leva em consideração fatores inatos ou de resposta imune celular, porém, a resposta imune humoral adaptativa também é um fator importante na prevenção de doenças infecciosas (BONILLA e OETTGEN, 2010) e com isso, no presente estudo tentamos observar o efeito de BSFL na soroconversão de uma vacina trivalente. No entanto, o resultado observado foi de que a suplementação não foi capaz de induzir qualquer efeito (negativo ou positivo) na soroconversão dos camundongos vacinados, resultado semelhante já foi observado em porcos, onde a substituição da fonte de proteína em diferentes concentrações (25 e 50%) não influenciou na soroconversão dos animais vacinados (CROSBIE et al, 2021). Mesmo não tendo afetado a resposta humoral induzida pela vacina, ainda é possível que a suplementação tenha modulado

a resposta celular específica dos camundongos, o que deve ser analisado e discutido em estudos já prospectados por nosso grupo de pesquisa.

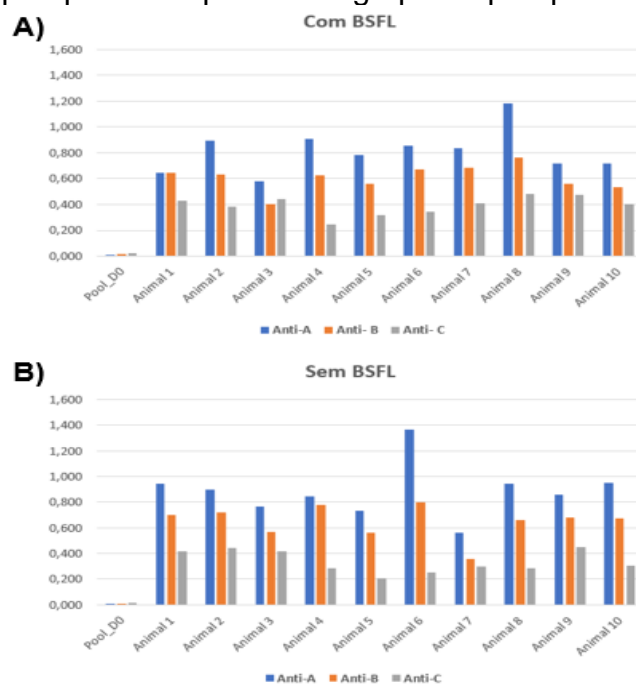


Figura 1: Absorbâncias de amostras de animais com e sem suplementação em ensaio ELISA. A) Absorbâncias referentes aos animais que receberam suplementação; B) Absorbâncias referentes aos animais que não receberam suplementação.

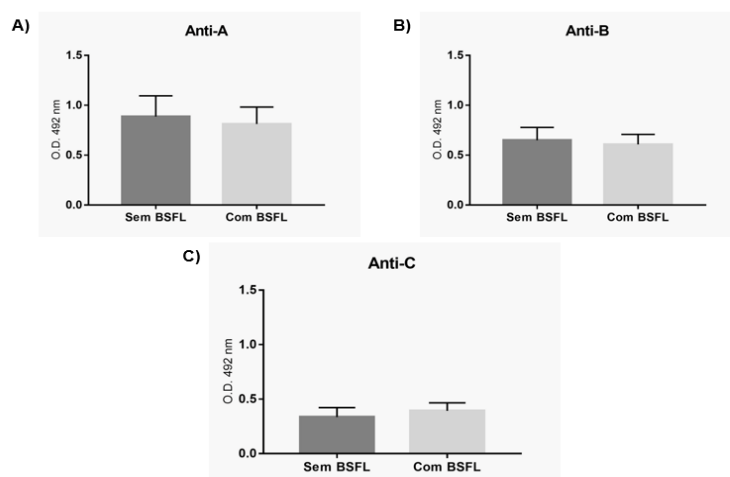


Figura 2: Absorbâncias médias de amostras dos animais com e sem suplementação.

O desenvolvimento tecnológico em Biotecnologia apresenta um alto risco de investimento, levando em consideração o nível de inovação inerente a estes produtos, sendo assim, é natural projetos cujos resultados sejam divergentes com a hipótese levantada em seu princípio (CARNEIRO et al, 2018). No presente estudo, os resultados sugerem que a BSFL não afeta a resposta humoral dos camundongos, o que ainda corroborando a estudos que indicam esta como uma ração alternativa em potencial (HEUEL et al, 2021; GARIGLIO, 2021; BIASATO et al, 2016), visando uma produção circular, ambientalmente correta e que não afeta negativamente a qualidade e segurança da produção.

## 4. CONCLUSÕES

Por fim, concluímos que a BSFL, quando utilizada como suplementação alimentar (10%) não alterou negativamente a capacidade de resposta humoral de camundongos BALB/c, reafirmando a BSFL como suplemento inovador com potencial a substituir as fontes de proteína convencionalmente utilizadas pelo setor pecuário.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Biasato, I; Renna, M; Gai, F; Dabbou, S; Meneguz, M; Perona, G; Martinez, S; Lajusticia, A.C.B; Bergagna, S; Sardi, L; Capucchio, M.T; Bressan, E; Dama, A; Schiavone, A; Gasco, L. Partially defatted black soldier fly larva meal inclusion in piglet diets: effects on the growth performance, nutrient digestibility, blood profile, gut morphology and histological features. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, n. 12; 2019.
- 2 Bonilla, F. A.; Oettgen, H. C. Adaptive immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 SUPPL. 2, p. S33–S40, 2010.
- 3 Carneiro, R.C; Salgado, E.G; Pereira, A.A.S; Alvarenga, A.D. Principales riesgos del proceso de desarrollo em biotecnología. **Innovar**, v. 28, n. 70; 2018.
- 4 Chemello, G; Renna, M; Caimi, C; Guerreiro, I; Oliva-Teles, A; Enes, P; Biasato, I; Schiavone, A; Gai, F; Gasco, L. Partially Defatted Tenebrio molitor Larva Meal in Diets for Grow-Out Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): Effects on Growth Performance, Diet Digestibility and Metabolic Responses. **Animals**, v. 10, n. 2; 2020.
- 5 Gariglio M, Dabbou S, Gai F, Trocino A, Xiccato G, Holodova M, Gresakova L, Nery J, Bellezza Oddon S, Biasato I, Gasco L, Schiavone A. Black soldier fly larva in Muscovy duck diets: effects on duck growth, carcass property, and meat quality. **Poultry Science**, v. 100, n. 9; 2021
- 6 Heuel, M; Sandrock, C; Leiber, F; Mathys, A; Gold, M; Zurbrugg, C; Gangnat, I.D.M; Kreuzer, M; Terranova, M. Black soldier fly larvae meal and fat can completely replace soybean cake and oil in diets for laying hens. **Poultry Science**, v. 100, n. 6; 2021.
- 7 LEE, J. et al. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae enhances immune activities and increases survivability of broiler chicks against experimental infection of *Salmonella Gallinarum*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 5, p. 736–740, 2018.
- 8 LI, B; Zeng, Q; Song, Y; Gao, Z; Jiang, L; Ma, H; He, J. The effect of fly maggot in pig feeding diets on growth performance and gut microbial balance in Ningxiang pigs. **Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, n. 6; 2019.
- 9 Salomone, R; Saija, G; Mondello, G; Giannetto, A; Fasulo, S; Savastano, D. Environmental impact of food waste bioconversion by insects: Application of Life Cycle Assessment to process using *Hermetia illucens*. **Journal of Cleaner Production**, v. 140, n. 2; 2016.
- 10 United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2022). World Population Prospects 2022: Summary of Results. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3.
- 11 Zhang, Y; Yang, C; Li, C; Xu, Z; Peng, P; Xue, C; Tomberlin, J.K; Hu, W; Cao, Y. Black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larval diet improves CD8+ lymphocytes proliferation to eliminate chicken coronavirus at an early infection stage. **Veterinary Microbiology**, v. 260, n. July, p. 109151, 2021.
- 12 CROSBIE, M; Zhu, C; Karrow, N.A; Hube, L. The effects of partially replacing animal protein sources with full fat black soldier fly larvae meal (*Hermetia illucens*) in nursery diets on growth performance, gut morphology, and immune response of pigs. **Translational Animal Science**, v. 5, n. 2, p. 1–11, 2021.