

Universidad de La Laguna

Facultad de Ciencias: Sección de Biología

Departamento de Biología animal, Edafología y Geología

**Estudio del metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados
en *Gryllus assimilis***

**Study of polyunsaturated fatty acids metabolism in *Gryllus
assimilis***



Trabajo de Fin de Grado

Luis Lourido Saavedra

Tutorizado por Covadonga Rodríguez González y Manuel Alejandro Marrero Arteaga

Grado en Biología, junio de 2021

Resumen

La entomofagia es el consumo de insectos por los seres humanos, y es una opción que complementa la dieta de 2000 millones de personas. En 2030 tendremos que alimentar a más de 9.000 millones de personas, además de a los miles de millones de animales que se crían anualmente con fines alimentarios, recreativos o como mascotas. Los insectos destacan por su capacidad de producir proteína de manera más eficiente y ambientalmente sostenible que las ganaderías tradicionales. Sin embargo, los insectos presentan una composición nutricional y biodisponibilidad de nutrientes muy variada entre especies y estadios de su ciclo de vida, por lo que se requieren estudios metabólicos de las principales especies destinadas a la insecticultura, con la finalidad de estandarizar dichos valores. El objetivo del trabajo es obtener un método para incorporar ácidos grasos marcados radioactivamente al metabolismo de insectos de la especie *Gryllus assimilis*, y conocer su capacidad de bioconversión. La incorporación mejora significativamente cuando el ácido graso marcado radioactivamente es metabolizado al menos una hora y media en el organismo del grillo. Las incubaciones con 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3 marcados con 1-14C mostraron actividades de bioconversión ya descritas en grillos como la de las elongasas o la de las desaturasas $\Delta 9$ y $\Delta 12$. Sin embargo, también se observó la capacidad de desaturación mediante las actividades $\Delta 6$ y $\Delta 15$, no reportadas con anterioridad.

Palabras claves: PUFA, insectos comestibles, *Gryllus assimilis*, metabolismo de ácidos grasos, INRAD

Abstract

Entomophagy is the consumption of insects by humans and is an option that supplements the diet of 2 billion people. In 2030, we will have to feed more than 9 billion people in addition to the billions of animals that are raised annually for food, recreationally, or pet purposes. Insects stand out for their ability to produce protein more efficiently and environmentally sustainable than traditional livestock. However, insects have a wide variety of nutritional compositions and bioavailability of nutrients between species and stages of their life cycle, for which metabolic studies of the main species destined for insecticulture are required, to standardize these values. The aim of this work is to obtain a method to incorporate radiolabeled fatty acids into the metabolism of insect species *Gryllus assimilis* and learn about their bioconversion capacity. Incorporation improves significantly when radiolabeled fatty acids are metabolized for at least an hour and a half in the cricket's organism. The incubation of radiolabeled 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3 marked with 1-¹⁴C showed activities of bioconversion already described in crickets as elongases or $\Delta 9$ and $\Delta 12$ desaturases. However, the ability to desaturate using $\Delta 6$ and $\Delta 15$ activity was also observed which have barely been described in this group.

Key words: PUFA, edible insects, *Gryllus assimilis*, fatty acids metabolism, INRAD

1. Introducción.....	1
1.1 Búsqueda de alternativas más sostenibles para el consumo de proteína animal	1
1.2 La insecticultura como posible solución al problema	3
1.3 Introducción a los PUFA, y su importancia en la dieta humana	4
1.4 Contexto y aproximación al metabolismo lipídico de los PUFA en la especie <i>Gryllus assimilis</i>	6
2. Objetivos.....	7
2.1 Objetivos generales	7
2.2 Objetivos específicos.....	7
3. Material y métodos	8
3.1 Diseño experimental.....	8
3.2 Extracción lipídica de los grillos	9
3.3 Incorporación de los ácidos grasos radioactivos al lípido total en grillos	10
3.4 Transmetilación de lípidos para la obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)	10
3.5 Purificación de los ésteres metílicos de ácidos grasos en una placa de TLC (Thin layer chromatography)	11
3.6 Incubación de las placas y lectura de las bandas radioactivas.....	11
3.7 Análisis estadístico	12
4. Resultados y discusión	12
4.1 Análisis de la incorporación radiactiva (INRAD).....	12
4.2 Análisis de la actividad elongasa y desaturasa en el metabolismo mediante seguimiento radioactivo.....	14
5. Conclusiones.....	17
6. Conclusions	17
7. Bibliografía.....	18

1. Introducción

1.1 Búsqueda de alternativas más sostenibles para el consumo de proteína animal

La sobreexplotación de campos de cultivos para la alimentación ganadera, junto a la gran huella hídrica debida a esta actividad, acarrea grandes problemas medioambientales. El gasto de agua necesario para generar una caloría de carne de vaca es hasta 20 veces mayor que el usado en cereales y tubérculos. En el caso de la producción de proteína ocurre algo parecido, la leche, los huevos y la carne de pollo, necesitan un consumo de agua de hasta 1.5 veces mayor que el requerido por las legumbres (Mekonnen & Hoekstra, 2012).

En países con salarios medios o bajos está proyectado un aumento en el consumo de proteína animal, entre un 22% para 2030 y un 25% para 2050 (Halloran, 2013).

Por lo que la búsqueda de nuevos alimentos capaces de suplir las necesidades alimentarias de los seres humanos y los animales de compañía o destinados para el consumo, se perfila como una labor fundamental.

Una opción que ha surgido estos últimos años es la insecticultura, una alternativa a las principales fuentes de alimentación del mercado. Se calcula que ya unos 2.000 millones de personas los consumen habitualmente (FAO, 2013). Los insectos tienen diferentes hábitos alimenticios, y en algunas ocasiones son alimentados con productos cuya eliminación supone costes económicos y medioambientales, como, por ejemplo: restos de mataderos, excedentes de restaurantes y supermercados o remanentes de cereales (Sánchez-Muros et al., 2014).

Desde un punto de vista medioambiental, el cultivo de insectos es una actividad sostenible; se suelen llevar a cabo en almacenes, sin necesidad de ocupar extensos terrenos o de tener un excesivo consumo de agua, especialmente comparado con los cultivos tradicionales, como la soja (Sánchez-Muros et al., 2014). Otro aspecto positivo de la insecticultura es su bajo impacto en la huella de carbono. La contribución relativa de equivalentes de CO₂ por parte de la industria ganadera, genera el 18% del total de los

gases de efecto invernadero con origen antropogénico (Steinfeld et al., 2006). Al comparar la producción de CO₂ entre el ganado tradicional con la de insectos de consumo habitual, podemos observar una disminución de entre el 18% y 54% respecto al ganado vacuno, y entre un 11% y 34% en relación al porcino (Ooninx et al., 2010).

Otro de los factores que apoyan la sostenibilidad de esta práctica es su baja producción de amoníaco en comparación a la ganadería tradicional, una molécula que afecta principalmente a los suelos acidificándolos y nitrificándolos (Ooninx et al., 2010), además también es uno de los principales contaminantes de los ecosistemas dulceacuícolas, tanto en superficie como en aguas subterráneas (Aarnink et al., 1995). Sumado a todo lo anterior, ciertas bacterias presentes en el suelo tienen la capacidad de transformar el amoníaco libre en NO₂, otro de los gases que contribuyen al efecto invernadero (Wrage et al., 2001).

Una grandísima diversidad de insectos forman parte de dietas tradicionales, especialmente en el continente asiático, seguido por África y Sudamérica, donde muchos países afectados por la malnutrición infantil, plantean la insecticultura como un complemento para atajar dicho problema (Roos, 2018). En estos mismos continentes, el uso de insectos para alimentar a los animales de granja está ampliamente extendido, pero aún en el mundo occidental existe cierta reticencia cultural (Chaalala et al., 2018), aunque la opinión general parece estar cambiando. Según un informe de caso empresarial del consenso llevado a cabo por PROteINSECTS en Flandes (Bélgica), un 73% de la población estarían dispuestos a comer carne de pescado, cerdo o pollo de un animal alimentado con proteína de insecto (Smith & Barnes, 2015).

En 2005, con la formulación de nuevos alimentos por parte la Unión Europea (UE), se insta a revisar, clarificar y actualizar, sobre la base de los avances científicos y tecnológicos de las categorías de alimentos que constituyen los llamados nuevos elementos, incluyendo en estas a los insectos (Reglamento UE 2015/2283). Actualmente, en la UE está permitido el uso de proteína transformada derivada de insectos únicamente para la acuicultura, aunque diversos estudios han demostrado que los insectos de granja podrían constituir una solución alternativa y sostenible a las fuentes convencionales de proteína animal, destinadas a la alimentación de no rumiantes (Reglamento UE 2017/893).

1.2 La insecticultura como posible solución al problema

Una de las características que más destaca de los insectos es su eficiente tasa de conversión de la materia orgánica, debido a que no usan la energía para mantener una alta temperatura corporal (Nijdam et al., 2012). El principal aporte nutricional de los insectos es la porción proteica, que en comparación con las proteínas de origen vegetal o provenientes de la ganadería tiene mayores niveles de proteínas de alta calidad en términos de valor nutricional, nivel total de proteínas y perfil de aminoácidos esenciales (Rumpold & Schlüter, 2013). Se trata de un hecho de especial importancia, debido a la necesidad de producir una mayor cantidad de proteína de manera más eficiente y ambientalmente más sostenible que las ganaderías tradicionales para hacer frente a las predicciones de más de 9 millones de habitantes a nivel mundial en el año 2050 (Chaalala et al., 2018).

Con más de 2000 especies registradas como comestibles, la diversidad en la composición nutricional es igualmente elevada (Roos, 2018). Dentro del orden Orthoptera, se encuentran algunas de las especies altamente favorecidas para ser consumidas debido a que presentan una metamorfosis incompleta, es decir, no poseen un estado de larva o pupa entre la eclosión del huevo y el grillo o saltamontes adulto (Roos, 2018). En nuestro estudio nos centraremos en la especie *Gryllus assimilis*, la cual se encuentra estrechamente emparentada con su congénere *Gryllus bimaculatus*, en el cual se destaca un mayor contenido en proteínas y minerales, y una menor cantidad de ácidos grasos saturados que ciertas carnes de vacuno, cerdo o pollo (Ghosh et al., 2017). La abundancia de estos macronutrientes (proteínas, carbohidratos y lípidos) puede ayudar a disminuir los casos de malnutrición que acaban en una desnutrición proteico-energética (Ghosh et al., 2017).

Pero la aportación de los insectos a la alimentación va más allá de los macronutrientes mencionados, ya que el completo funcionamiento del organismo del insecto también requiere un complejo de minerales y vitaminas para mantener sus funciones metabólicas (Roos, 2018), con valor nutricional añadido para el consumo humano. Tanto el contenido, como la biodisponibilidad de estos nutrientes varían entre las diferentes especies de insectos, así como, en la fase de la metamorfosis en la que se encuentran

(Rumpold & Schlüter, 2013), y también, son aspectos que vienen influidos por el estado metabólico del propio insecto, y el perfil de la dieta suministrada (Roos, 2018). El caso de los ácidos grasos es idéntico, es decir, el estudio de su composición en insectos solo nos aporta una observación en un momento concreto de un conjunto de procesos dinámicos y continuos (Stanley-Samuelson et al., 1988). Con la finalidad de estandarizar estos valores nutricionales, es fundamental conocer el metabolismo lipídico de las diferentes especies para producir dietas específicas y piensos de mayor eficiencia.

1.3 Introducción a los PUFA, y su importancia en la dieta humana

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Long chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFA) son componentes mayoritarios de las moléculas lipídicas complejas, y están involucrados en numerosos procesos biológicos fundamentales. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) pasan a considerarse de cadena larga cuando poseen un número mayor o igual a 20 átomos de carbono (C20) con más de 2 insaturaciones, teniendo la primera insaturación en la posición 3 con respecto al metilo terminal de la cadena hidrocarbonada (carbono omega; ω o n), en el caso de los omega 3 (n-3), o en la posición 6, en el caso de los omega 6 (n-6).

Estudios llevados a cabo, principalmente en vertebrados, han demostrado que los PUFA pueden ser sintetizados por la acción coordinada de dos conjuntos de enzimas (Figura 1), llamadas desaturasas de ácidos grasos (Fads) y elongasas de ácidos grasos (Elovl) (Castro et al., 2016).

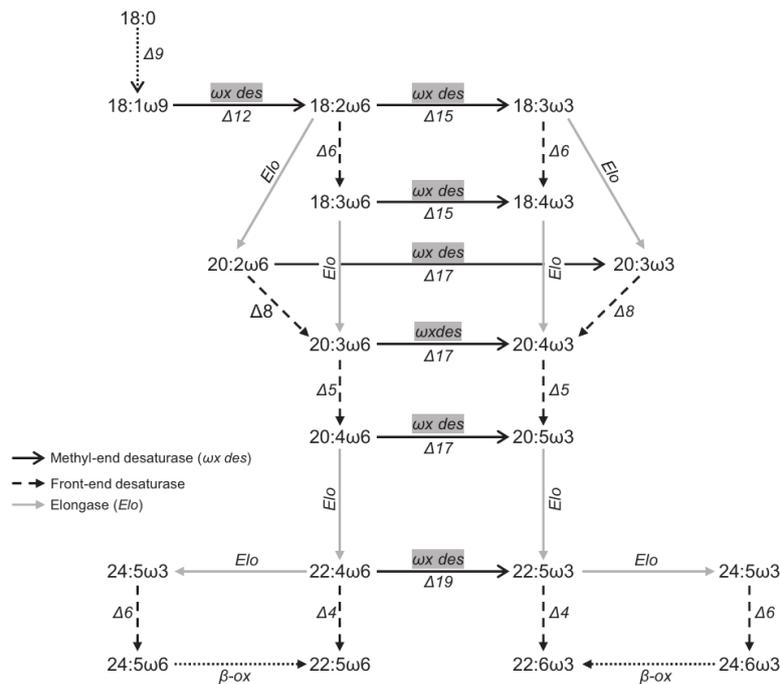


Figura 1: Ruta de biosíntesis de los LC-PUFA de precursores de 18 átomos de carbono (D. Garrido et. al., 2019).

Las elongasas catalizan una reacción de condensación que añade dos carbonos a la cadena del ácido graso, mientras que las desaturasas se encargan de añadir un doble enlace. Estas enzimas actúan inespecíficamente para sustratos homólogos omega-6 u omega-3 (Castro et al., 2016). La nomenclatura usada para este trabajo es la denominada Δx (delta-x), la cual se usa comúnmente para especificar la actividad de las Fads. En esta nomenclatura, los dobles enlaces se numeran desde el extremo carboxilo de la molécula, por lo que una Fads que introduzca un doble enlace a cinco carbonos del extremo carboxilo de la cadena alifática decimos que tiene una actividad Δ5 (Castro et al., 2016).

Mientras que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados pueden ser sintetizados por todos los organismos, los PUFA solo son sintetizados *de novo* por plantas, hongos, algunos microorganismos acuáticos y unos pocos organismos más (Pereira et al., 2003). La mayoría de los animales son incapaces de sintetizar los PUFA, debido a que no poseen las enzimas necesarias para formar el ácido linoleico (LA; 18:2n-6) ni el linolénico (LNA; 18:3n-3), por lo que se consideran ácidos grasos esenciales en la mayoría de ellos.

Los humanos poseen una capacidad limitada de síntesis de ciertos ácidos grasos, especialmente cuando hablamos de los LC-PUFA de la serie omega-3 (n-3), como el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) o el ácido docosahexanoico (DHA, 22:6n-3) involucrados en procesos de homeostasis, en los mecanismos de inflamación y en la respuesta inmune (Zárate et al., 2017). También, se ha relacionado el aumento del consumo de ácidos grasos n-3, y una disminución del ratio entre los ácidos grasos omega 6/omega 3, que en dietas occidentales promedia 15:1, hasta 2-4:1; con una reducción del riesgo de sufrir obesidad (Simopoulos, 2016), y numerosos tipos de cáncer como los de mama, los renales, de próstata de colon (Simopoulos, 2008). Sumado a todo esto, el DHA juega un papel fundamental como el principal ácido graso n-3 en la materia gris cortical, y recientemente se ha demostrado la importancia de la incorporación de este ácido graso y sus precursores en pacientes con trastornos depresivos graves y bipolares (Zárate et al., 2017).

1.4 Contexto y aproximación al metabolismo lipídico de los PUFA en la especie *Gryllus assimilis*

Una de las especies de mayor interés en la insecticultura es el conocido como grillo de campo jamaicano (*Gryllus assimilis*), la especie con la que trabajaremos. Se distribuye por las islas del Caribe, el sur de los Estados Unidos, México y otras partes de Sudamérica (Alexander & Walker, 1962), pero puede ser criado eficazmente en largas colonias, en un ambiente controlado y de forma similar al grillo europeo (*Acheta domesticus*) (Clifford, 1990). Su inmunidad al densovirus de *Acheta domesticus* (AdDNV) que genera parálisis en los grillos y hacía peligrar las instalaciones comerciales de cultivo del grillo común europeo, lo ha llevado a ser el estándar de grillo disponible para la alimentación de mascotas (Szelei et al., 2011).

Los lípidos en este clado de animales suponen el segundo macronutriente en abundancia, y su valor se ve aún más incrementado en los estados larvales. Los triacilglicéridos constituyen aproximadamente un 80% de ese conjunto, seguido por los fosfolípidos que representan menos de un 20%, teniendo en cuenta que varían según la etapa metabólica (Castro et al., 2018).

Respecto a la composición de ácidos grasos, algunos trabajos estudian la capacidad de bioconversión de ácidos grasos de cadena corta (Blomquist et al., 1982; Cripps et al., 1988, 1990; Riddervold et al., 2002; Zhou et al., 2008). Sin embargo, en el caso de los PUFA, los estudios se limitan al grillo doméstico (*Acheta domesticus*), donde se investiga la actividad de la desaturasa $\Delta 12$ para transformar el ácido Oleico (18:1n-9; OA) en Ácido Linoleico (18:2n-6; LA), que ha sido demostrado en los tejidos axénicos. A todo esto se suma el aislamiento y caracterización del gen de la $\Delta 12$, el cual parece haber evolucionado de forma independiente a otros grupos de insectos desde una $\Delta 9$ ancestral (Zhou et al., 2008). También se ha conseguido aislar y caracterizar la desaturasa $\Delta 9$ (Riddervold et al., 2002), encargada del primer paso de esta ruta, transformando el ácido esteárico (18:0; SA) en ácido oleico.

Otros estudios realizados en otra especie de la familia, el grillo macho (*Teleogryllus commodus*), han sido capaces de identificar cierta capacidad de biosíntesis de novo de ácido araquidónico (20:4n-6; ARA) y ácido eicosapentanoico (20:5n-3, EPA) desde sus precursores ácido linoleico (18:2n-6, LA) y ácido linolénico (18:3n-3, ALA), respectivamente (Jurenka et al., 1988).

2. Objetivos

2.1 Objetivos generales

En primer lugar, diseñar un protocolo que permita el estudio del metabolismo *in vivo* de los PUFA en la especie *Gryllus assimilis*, optimizando la tasa de incorporación del ácido graso radioactivo.

En segundo lugar, aportar nuevos datos sobre el metabolismo lipídico de la especie *Gryllus assimilis*, específicamente, sobre su capacidad para transformar los ácidos grasos de 18 átomos de carbono; con la finalidad de aportar conocimientos que ayuden a mejorar el valor nutricional de la especie para la estandarización de su cultivo.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar el porcentaje de incorporación del 18:1n-9 marcado con $1-^{14}\text{C}$ en diferentes tiempos de incubación en ejemplares de *Gryllus assimilis*.

- Comparar el patrón de incorporación radiactiva en ejemplares de *Gryllus assimilis* incubados con los ácidos grasos 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3 marcados con 1-¹⁴C.

-Estudiar la capacidad de *Gryllus assimilis* para elongar y/o desaturar los ácidos grasos 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3 marcados con 1-¹⁴C.

3. Material y métodos

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron juveniles de *Gryllus assimilis*, cedidos por la Fundación Neotrópico (Tenerife), alimentados con pienso de conejo Cunilap (Nanta) y mantenidos a una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Todos los análisis fueron llevados a cabo en el laboratorio de Fisiología Animal, en el departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Universidad de La Laguna, a excepción de la lectura de las placas de ácidos grasos marcados con 1-¹⁴C que se realizó en el Servicio Instalación Radioactiva del Campus Anchieta de la Universidad de La Laguna.

3.1 Diseño experimental

Para determinar qué tiempo de incubación es el óptimo para maximizar la incorporación de los ácidos grasos marcados con 1-¹⁴C, se pesaron 12 grillos para obtener el peso fresco (PF), y se separaron en botes individuales, distribuidos en 3 tratamientos, a los que se les suministró el [1-¹⁴C] 18:1n-9, pasadas 24 horas en aislamiento. El ácido graso marcado radioactivamente fue suministrado en una gota de 10 μl , constituida por un complejo (BSA-FAF) formado por suero de albúmina bovina (BSA; del inglés bovine serum albumin) y el ácido graso libre marcado radioactivamente (FAF; del inglés fatty acid free).

El tiempo de incubación para cada tratamiento fue de media hora (0.5 h), 1 hora y media (1.5 h) y 3 horas (3 h) respectivamente. Adicionalmente, un control negativo fue llevado a cabo con cuatro grillos, a los cuales se les suministró albúmina sin ácido graso marcado radioactivamente. Una vez los insectos de cada tratamiento alcanzaron el

tiempo de incubación tras ingerir la gota de albúmina con los ácidos grasos, se introdujeron en un congelador a -20°C dentro de tubos eppendorf durante una hora, pasado este tiempo, se conservaron en un ultracongelador a -81°C con la finalidad de que se conservaran lo mejor posible hasta futuros análisis.

Para estudiar la capacidad de transformación de los diferentes ácidos grasos, se usaron 16 grillos, a los cuales agrupamos en 4 grupos formados por 4 ejemplares cada uno diferenciados por el ácido graso que se añadía al complejo formado junto al BSA, y un control negativo sin incubación radiactiva formado por otros 4 grillos. En el caso del primer grupo se usó el $[1-^{14}\text{C}]$ Ácido esteárico (18:0), para el segundo el $[1-^{14}\text{C}]$ Ácido oleico (18:1n-9), en el tercero usamos el $[1-^{14}\text{C}]$ Ácido linoleico (18:2n-6), y finalmente, para el último añadimos el $[1-^{14}\text{C}]$ Ácido linolénico (18:3n-3). El tiempo de incubación fue de 3 horas una vez que cada grillo se bebió la gota con el complejo BSA-FAF, posteriormente fueron introducidos una hora a -20°C para introducirlos en un congelador a -81°C hasta el día en el que se realizaron las extracciones lipídicas de los mismos.

3.2 Extracción lipídica de los grillos

La extracción de lípidos se realizó siguiendo el método Folch (1957), adaptado por Christie (Christie, 2003), a partir de los individuos completos de *Gryllus assimilis*. Previamente, se pesó cada individuo y se introdujo en un tubo de ensayo, para homogeneizarlo con 3 ml de cloroformo-metanol (2:1, v/v) y la ayuda de un taladro que presenta un brazo homogeneizador de teflón. Durante todo el proceso de extracción se trabajó con las muestras en una bandeja de hielo para evitar la degradación de los ácidos grasos debido al calor generado por el taladro. Los 3 ml de solventes se reparten para realizar la extracción de varias fases, y para finalizar, se llevó a cabo un lavado final con el mismo solvente, para asegurar que no queda lípido en el teflón o en las paredes del tubo.

A continuación, se añadieron 2.5 ml de KCL al 0.88%, tras esto, se agitó en el vortex y se centrifugó a 1700 r.p.m. durante 5 minutos a una temperatura de 4°C para separar los lípidos a la fase inferior. Tras recuperar la fase inferior, se evapora en atmósfera de nitrógeno, transvasando los lípidos del tubo a un vial de cristal, previamente pesado,

realizando varios lavados con cloroformo-metanol (2:1, v/v). Se evapora el solvente en una atmósfera de nitrógeno, y se deja durante 12-15 horas en un desecador al vacío y en oscuridad.

Por último, se pesan los viales de cristal con el lípido seco y se resta el peso de los viales vacíos pesados el día anterior para determinar el lípido total. A continuación, se resuspende el lípido total en cloroformo-metanol (2:1, v/v) con 0.01% de hidroxitolueno butilado (BHT), el cual ayuda a la preservación de los lípidos frente a la peroxidación. La concentración a la que se resuspende es a 10mg/ml, siempre y cuando el lípido total extraído sea menor a 15 mg, aumentando la concentración en valores mayores. Finalmente, se conserva en un congelador a -20°C hasta posteriores análisis.

3.3 Incorporación de los ácidos grasos radioactivos al lípido total en grillos

Para medir el grado de incorporación del sustrato radiactivo al lípido extraído, se añadieron 10 µl de lípido total de cada muestra en un tubo de centelleo, junto a 4.5 ml del líquido de centelleo, determinando la radioactividad incorporada, a partir de las medidas en DPM (desintegraciones por minuto). La radicación β se cuantificó en un contador de centelleo líquido (TRI-CARB 4810TR, Perkin Elmer, Singapur). Los resultados obtenidos en DPM se transformaron en pmol de ácido radioactivo/mg de PF (pmol.mg PF^{-1}), teniendo en cuenta la actividad específica de cada ácido graso (proporcionada por el fabricante), y el PF de cada individuo. Para calcular los DPM totales, con los que trabajamos, restamos el blanco a los DPM de cada muestra, para luego multiplicarlo por el peso del lípido total de la muestra y dividirlo por el volumen de centelleo y por 100.

3.4 Transmetilación de lípidos para la obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)

Se transmetiló 1mg de cada extracto lipídico para hidrolizar y metilar los ácidos grasos, y así obtener los esterres metílicos de ácidos grasos (FAMEs, del inglés Fatty acid methyl esters).

Para ello, se añadió 1ml de Tolueno y 2ml de Sulfúrico al 1% en Metanol a un tubo con el extracto lipídico seco. Se llena el tubo con nitrógeno y se tapa herméticamente, para dejarlo reaccionar en una manta calefactora a 50°C en oscuridad, durante 16 horas.

Tras dejar enfriar la muestra se añaden 2ml de KHCO₃ al 2% (p/v) y 5 ml de Hexano:Dietil éter 1:1 (v/v) con BHT al 0.01% y se agita fuertemente, para luego centrifugarlo a 1500 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Se transfiere la fase superior con los FAMES a un segundo tubo y se realiza otro lavado con 5ml de Hexano: Dietil éter, esta vez sin BHT, que se añade al tubo 1, se agita y se centrifuga en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Por último, se transfiere la fase superior, juntándola con la fase superior del primer lavado y se evapora todo el solvente.

3.5 Separación de los ésteres metílicos de ácidos grasos en una placa de TLC (Thin layer chromatography)

Se realizó una cromatografía en placa de sílice, impregnada previamente cada placa, con una solución de 2g de nitrato de plata en 20 ml de acetonitrilo.

Los ésteres metílicos redissueltos en 100µl de hexano en el tubo 2 se pincharon en la placa, junto con un estándar de ácidos grasos conocidos marcados radioactivamente.

La cromatografía se desarrolló en una solución de 95ml de Tolueno y 5 ml de acetonitrilo.

3.6 Incubación de las placas y lectura de las bandas radioactivas

Para detectar las bandas radioactivas, se introdujeron las placas en un cassette cerrado (Exposure Cassette-K, BioRad, Madrid, España) y en oscuridad, con una lámina de revelado sensible a la radioactividad (Imaging Screen-K, BioRad, Madrid, España) separadas por una lámina papel de aluminio para evitar contaminar con la muestra la lámina de revelado. Transcurridas dos semanas se procedió a escanear las imágenes obtenidas con un sistema de adquisición de imagen (Molecular Imager Fx, BioRad, Madrid, España) y a su procesado con el software Quantity One, versión 4.5.2, obteniéndose así la distribución relativa de las bandas correspondientes a la radioactividad incorporada de cada ácido graso.

3.7 Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA de una vía para determinar el efecto de los distintos tiempos de incubación tras ingerir el complejo BSA-FAF, en los valores de incorporación radioactiva, y otra para estudiar el efecto de la incubación de diferentes ácidos grasos en los valores de incorporación radioactiva. Para ello, se verificaron las hipótesis de normalidad y homocedasticidad de los datos. Los valores de incorporación radiactiva para los distintos tratamientos de tiempo fueron transformados con la raíz cuadrada para obtener la homocedasticidad a través de la prueba de Levene, pero ninguna transformación fue necesaria para los datos de incubación de los diferentes ácidos grasos. La normalidad de los residuos fue verificada con el test de Kolmogorov-Smirnov. Por último, se realizó un test post-hoc (Tukey), para comprobar qué tratamientos eran los que se diferenciaban entre sí. Las diferencias fueron consideradas significativas para un p-valor inferior a 0,05.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software IBM SPSS Statistics 25, USA.

4. Resultados y discusión

4.1 Análisis de la incorporación radiactiva (INRAD)

En la figura 2, se observa el patrón de incorporación del [$1-^{14}\text{C}$] ácido oleico (18:1n-9) en el lípido total (INRAD) para cada uno de los tratamientos. Los valores de INRAD corresponden a la media de los picomoles de carbono radioactivo referidos al PF de cada ejemplar (mg), para cada uno de los tratamientos de tiempo de incubación que se realizaron. Se detectaron diferencias significativas entre el tratamiento de 0.5 h y los de 1.5 h y 3 h, por lo que se determinó que la incorporación del lípido radioactivo mejora sustancialmente al mantener con vida a los grillos al menos 1.5 h tras haber ingerido la gota de albúmina con el ácido graso radioactivo. Debido a que los valores de incorporación eran mayores en 3 h que en 1.5 h, aún sin diferencias significativas, se decidió incubar los grillos durante tres horas en el segundo experimento.

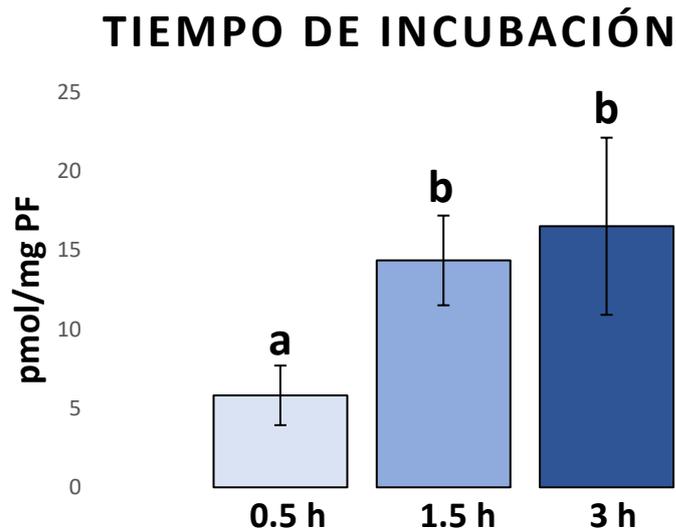


Figura 2: Incorporación radioactiva ($\text{pmol} \cdot \text{mg de PF}^{-1}$) según los tiempos de incubación del 18:1n-9. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Los valores de incorporación usando esta técnica superaron los obtenidos en experimentos preliminares llevados a cabo en el grupo de investigación, por lo que se concluyó que es un método más eficiente y a su vez, menos invasivo que el que se venía usando hasta ahora consistente en inyectar los ácidos grasos marcados radioactivamente en la hemolinfa, o en tejidos con alto porcentaje lipídico del animal. Además, se considera que esta técnica puede ayudar en el estudio lipídico de muchos insectos de pequeño tamaño, a los cuales la metodología previa de inyectar los ácidos grasos radioactivos era más invasiva y menos eficiente. Las técnicas que usan isótopos estables son consideradas como uno de los métodos más directos y sencillos para el estudio de la síntesis de ácidos grasos en insectos (Broschwitz et al., 2021), los cuales pueden ser suministrados vía oral como en este estudio o como recientemente se ha planteado, mediante la aplicación tópica al organismo a estudiar usando solventes no tóxicos como la acetona, aunque aún hacen falta estudios que aporten información acerca de la influencia de este solvente en el estado físico y los parámetros metabólicos del insecto (Jatsch & Ruther, 2021).

Los resultados de incorporación del segundo experimento (Tabla 1), muestran que no se encontraron diferencias significativas entre la incorporación al ser incubados con los diferentes ácidos grasos. Esto coincide con datos de otro trabajo en los que se incubaban los ácidos grasos radioactivos marcados de igual manera y no se observaban diferencias

significativas en el gusano del tabaco (Lepidoptera) (Gadelhak & Stanley-samuelson, 1994).

Tabla 1: Incorporación radioactiva ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg de peso fresco}^{-1}$), para los diferentes ácidos grasos incubados.

Tratamientos	INRAD
18:0	2.29 ± 0.73
18:1 n-9	3.44 ± 2.65
18:2 n-6	1.97 ± 2.16
18:3 n-3	2.84 ± 2.72

INRAD, incorporación radioactiva. Los valores se expresan como medias \pm desviación estándar, $n=4$. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

4.2 Análisis de la actividad elongasa y desaturasa mediante seguimiento radioactivo

Debido a que las placas de TLC deben estar un tiempo prolongado de unas 2 semanas, impresionándose (para detectar las bandas de los productos radioactivos) y no se dispone de un número suficiente de muestras ya analizadas para realizar un análisis cuantitativo, se aportarán imágenes de las placas con mayor transformación o consideradas de mayor relevancia para la discusión, la cual se hará de manera cualitativa.

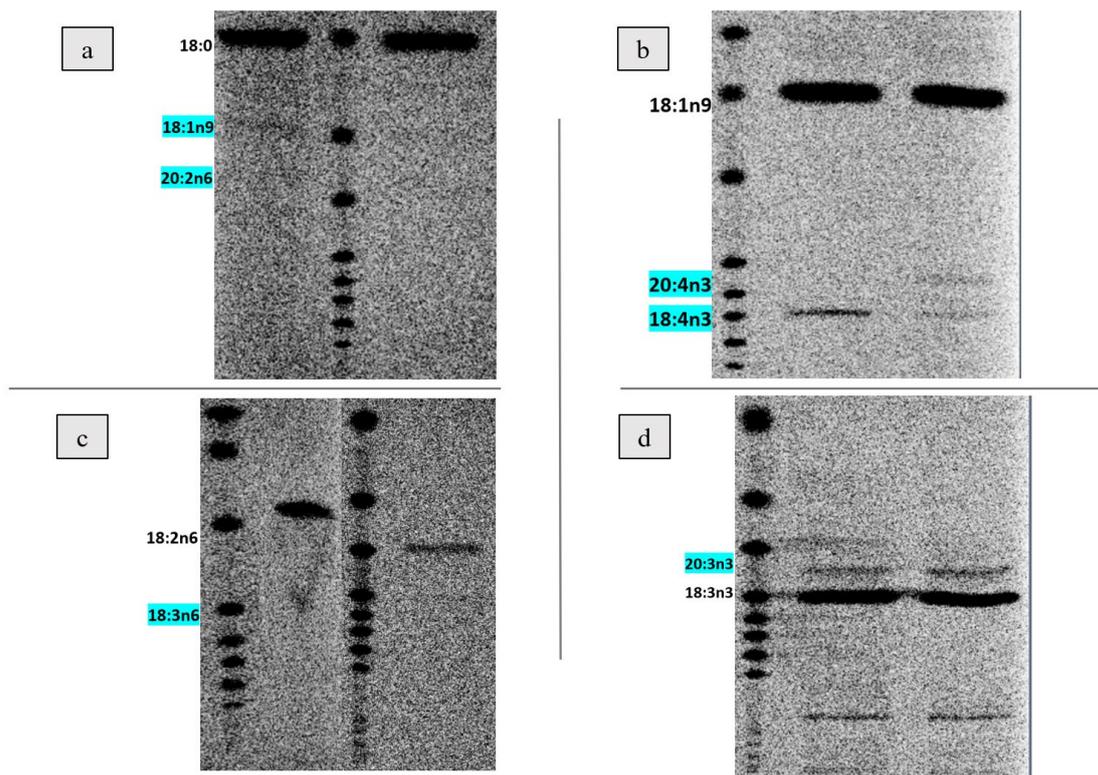


Figura 3: Bioconversión del $[1-^{14}\text{C}]$ 18:0 (a); 18:1n-9 (b); 18:2n-6 (c); y 18:3n-3 (d). En azul aparecen los subproductos obtenidos.

Entre los grillos incubados con el $[1-^{14}\text{C}]$ 18:0 (Figura 3a), se observó bioconversión en 2 de ellos, mostrando dos bandas identificadas como 18:1n-9 y 20:2n-6. La transformación hasta 18:1n-9 implica la actividad de una desaturasa $\Delta 9$. Una desaturasa con esta actividad ya se ha caracterizado en otra especie de la familia (Gryllidae), el grillo doméstico (*Acheta domesticus*) (Riddervold et al., 2002). La otra banda que se puede apreciar en la figura 3a, fue identificada como 20:2n-6. Para alcanzar este ácido graso a partir del 18:1n-9 siguiendo la ruta metabólica (Figura 1), ha de ocurrir una desaturación, mediada por una $\Delta 12$, hasta 18:2n-6 y una posterior elongación a 20:2n-6. Estos resultados concuerdan con la existencia de una desaturasa con actividad $\Delta 12$ demostrada en *Acheta domesticus* mediante su aislamiento y caracterización funcional (Zhou et al., 2008).

El LA (18:2n-6), juega un papel fundamental en el metabolismo de los insectos, tanto en las membranas celulares como componente importante para crear el entorno fluido de la membrana, necesario para que se lleven a cabo numerosos procesos celulares (Chyb et al., 1999); como en la biosíntesis de prostaglandinas y eicosanoides, algunos

de ellos implicados en mediar la inmunidad celular a ataques microbianos, la respuesta febril a la infección y en la biología reproductiva (Stanley, 2006). Hasta hace unos años se pensaba que la biosíntesis de LA no era llevada a cabo por animales, pero diversos estudios han contradicho esta afirmación, detectando biosíntesis *de novo* en un gran número de artrópodos de diferentes grupos como avispas (Broschwitz et al., 2021), ácaros (Aboshi et al., 2013; Brückner & Heathoff, 2020) o colémbolos (Malcicka et al., 2017), entre otros. En el caso de los grillos, llama la atención que aun ingiriendo una alta proporción de ácidos grasos en la dieta, incluyendo LA, poseen la maquinaria enzimática para sintetizar estos ácidos grasos, lo que hace sospechar que esta capacidad de biosíntesis de LA tiene su origen en la participación de este ácido graso en una ruta metabólica sumamente especializada para la producción de importantes metabolitos celulares (Batcabe et al., 2000).

En la figura 3b, se pueden observar los dos ejemplares incubados con $[1-^{14}\text{C}]$ 18:1n-9 que presentaron también bioconversión de este ácido graso. En los dos casos aparece el 18:4n-3, y en uno de ellos podemos identificar otra banda como el 20:4n-3. Para alcanzar dichos ácidos grasos, es necesaria la acción de desaturasas con actividad $\Delta 15$ y $\Delta 6$. Existen dos posibles vías para llegar a estos intermediarios (Figura 1), con una primera desaturación por parte de una $\Delta 15$ hasta el 18:3n-3 y una posterior desaturación mediada por una $\Delta 6$ para generar 18:4n-3; o de manera inversa, con una desaturación llevada a cabo por una $\Delta 6$ hasta 18:3n-6 y a continuación una desaturación mediada por una $\Delta 15$ para generar 18:4n-3; y finalmente un paso común en ambas posibilidades que es la elongación del 18:4n-3 hasta 20:4n-3. La síntesis *de novo* de estos ácidos grasos también ha sido descrita en *Teleogryllus commodus*, los cuales se encuentran en mayor proporción en los testículos y las glándulas accesorias (Russell A. Jurenka, et al., 1988), lo que proporciona una idea del gran valor que poseen estos ácidos grasos en grillos como precursores de hormonas lipídicas involucradas en la reproducción.

Respecto a la incubación con 18:2n-6 (Figura 3c) se observaron dos ejemplares con bioconversión del 18:2n-6 a 18:3n-6, lo cual es consistente con lo visto en el caso anterior indicando actividad $\Delta 6$. Esta actividad es muy poco frecuente en insectos, algunos de los ejemplos encontrados incluyen al gusano de la seda tassar chino (*Antheraea pernyi*, Lepidoptera), el cual se vincula a la síntesis de feromonas (Wang et al., 2010); y más recientemente también se ha detectado en la mosca soldado negra (*Hermetia illucens*, Diptera) (Hoc et al., 2020).

Finalmente, los ejemplares incubados con el LNA (18:3n-3) mostraron algunas bandas que no pudieron ser identificadas y que se asociaron a artefactos del estándar utilizado. Sin embargo, aparece en dos ejemplares elongación del 18:3n-3 hasta 20:3n-3. La escasa bioconversión hasta ácidos grasos de 20 átomos de carbono observada, también se ha visto reflejada en otro trabajo con la misma especie, donde ejemplares con disponibilidad de fuentes de LA mostraban acumulación de LNA pero poca bioconversión hasta ácidos grasos de 20 de átomos de carbono (Starčević et al., 2017).

Los experimentos con insectos no estériles en los que el ácido graso es ingerido no permiten descartar la actuación de microorganismos simbiotes en los procesos de bioconversión. La eliminación de estos mediante antibióticos (Brückner et al., 2020) pueden arrojar luz a esta cuestión. Sin embargo, la secuenciación y el análisis del genoma completo de las especies de mayor interés para la insecticultura, es un paso fundamental para despejar muchas de las dudas que aún se tienen acerca del metabolismo de estos insectos.

5. Conclusiones

- 1- La incorporación de los ácidos grasos marcados radioactivamente vía oral durante un periodo de incubación de 1.5 horas y 3 horas mejora significativamente respecto al tiempo de 0.5 horas.
- 2- El seguimiento metabólico de los ácidos grasos 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3 marcados con $1-^{14}\text{C}$ confirman la presencia de una desaturasa con actividad $\Delta 9$ y $\Delta 12$ como se ha descrito en otros grillos, y sugiere la existencia de actividad $\Delta 6$ y $\Delta 15$ en *Gryllus assimilis*.
- 3- No se observa bioconversión de ácidos grasos de más de 20 átomos de carbono a partir de precursores de 18 átomos de carbono en *Gryllus assimilis*.

6. Conclusions

- 1- Incorporation of radiolabelled fatty acids given orally improves significantly for an incubation period of 1.5 hours and 3 hours related to the 0.5 hours treatment.

- 2- The metabolic monitoring of the fatty acids 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6 and 18:3n-3 labeled with 1-¹⁴C confirm the presence of a desaturase with $\Delta 9$ and $\Delta 12$ activity as has been described in other crickets and suggests the existence of $\Delta 6$ and $\Delta 15$ activity in *Gryllus assimilis*.
- 3- No bioconversion of fatty acids with more than 20 carbon atoms was observed from precursors of 18 carbon atoms in *Gryllus assimilis*.

7. Bibliografía

- Aarnink AJA, Keen A, Metz JHM, Speelman L, V. M. (1995). Ammonia emission from houses for growing pigs as affected by pen design , indoor climate and behaviour.
- Aboshi, T., Shimizu, N., Nakajima, Y., Honda, Y., Kuwahara, Y., Amano, H., & Mori, N. (2013). Biosynthesis of linoleic acid in Tyrophagus mites (Acarina: Acaridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(11), 991–996.
- Alexander, R. D., & Walker, T. J. (1962). Two Introduced Field Crickets New to Eastern United States (Orthoptera: Gryllidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 55(1), 90–94.
- Batcabe, J. P., Howell, J. D., Blomquist, G. J., & Borgeson, C. E. (2000). Effects of developmental age, ambient temperature, and dietary alterations on $\Delta 12$ desaturase activity in the house cricket, *Acheta domesticus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44(3), 112–119.
- Blomquist, G. J., Dwyer, L. A., Chu, A. J., & Ryan, R. O. (1982). Biosynthesis of linoleic acid in a termite, cockroach and cricket. *Insect Biochemistry*, 12(3), 349–353.
- Broschwitz, B., Prager, L., Pokorny, T., & Ruther, J. (2021). De novo biosynthesis of linoleic acid is widespread in parasitic wasps. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology, March*.
- Brückner, A., & Heethoff, M. (2020). Fatty acid metabolism in an oribatid mite: de novo biosynthesis and the effect of starvation. *Experimental and Applied Acarology*, 81(4), 483–494.
- Brückner, A., Kaltenpoth, M., & Heethoff, M. (2020). De novo biosynthesis of simple aromatic compounds by an arthropod (*Archezogetes longisetosus*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1934).
- Castro, L. F. C., Tocher, D. R., & Monroig, O. (2016). Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. *Progress in Lipid Research*, 62, 25–40.
- Chaalala, S., Leplat, A., & Makkar, H. (2018). Importance of Insects for Use as Animal Feed in Low-Income Countries. *Edible Insects in Sustainable Food Systems*, 303-319 .
- Chyb, S., Raghu, P., & Hardie, R. C. (1999). Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature*, 397(6716), 255–259.
- Comisión Europea. (2015). Reglamento (UE) 2015/2283 relativo a los nuevos alimentos. *Diario Oficial de La Unión Europea*, 2015(L 327/1), 1–22.
- Craig W. Clifford, J. P. W. (1990). Methods for rearing the house cricket, *Acheta domesticus* (L.), along with baseline values for feeding rates, growth rates, development times, and blood composition. *Journal of applied entomology*. 109, 1–14.
- Cripps, C., Blomquist, G. J., & de Renobales, M. (1988). Changes in Lipid Biosynthesis During Development of the House Cricket, *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae). *Bulletin of the Entomological Society of America*, 34(3), 127–131.
- Cripps, Colleen, Borgeson, C., Blomquist, G. J., & de Renobales, M. (1990). The $\Delta 12$ -desaturase from the house cricket, *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae): Characterization and form of the substrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 278(1), 46–51.
- David W. Stanley-Samuelson, Russell A. Jurenka, C. C., & Gary J. Blomquist, and M. de R. (1988).

- Fatty Acids in Insects: Composition, Metabolism, and Biological Significance. *Insect Biochemistry and Physiology*, 33.
- de Castro, R. J. S., Ohara, A., Aguilar, J. G. dos S., & Domingues, M. A. F. (2018). Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges. *Trends in Food Science and Technology*, 76(April), 82–89.
- FAO. (2013). Edible insects. Future prospects for food and feed security. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Vol. 171).
- Gadelhak, G. G., & Stanley-samuelson, I. D. W. (1994). Incorporation of Polyunsaturated Fatty Acids into Phospholipids of Hemocytes from the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24(8).
- Ghosh, S., Lee, S. M., Jung, C., & Meyer-Rochow, V. B. (2017). Nutritional composition of five commercial edible insects in South Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(2), 686–694.
- Halloran A, V. P. (2013). La contribución de los insectos a la seguridad alimentaria, los medios de vida y el medio ambiente. *Fao*, 1–4.
- Hoc, B., Genva, M., Fauconnier, M. L., Lognay, G., Francis, F., & Megido, R. C. (2020). About lipid metabolism in *Hermetia illucens* (L. 1758): on the origin of fatty acids in prepupae. *Scientific Reports*, 0123456789, 1–8.
- Jatsch, A. S., & Ruther, J. (2021). Acetone application for administration of bioactive substances has no negative effects on longevity, fitness, and sexual communication in a parasitic wasp. *PLoS ONE*, 16(1 January), 1–19.
- Malcicka, M., Ruther, J., & Ellers, J. (2017). De novo Synthesis of Linoleic Acid in Multiple Collembola Species. *Journal of Chemical Ecology*, 43(9), 911–919.
- Mekonnen, M. M., & Hoekstra, A. Y. (2012). A Global Assessment of the Water Footprint of Farm Animal Products. *Ecosystems*, 15(3), 401–415.
- Nijdam, D., Rood, T., & Westhoek, H. (2012). The price of protein: Review of land use and carbon footprints from life cycle assessments of animal food products and their substitutes The price of protein: Review of land use and carbon footprints from life cycle assessments of animal food products. *Journal of food policy*, 37(6), 760–770.
- Oonincx, D. G. A. B., van Itterbeeck, J., Heetkamp, M. J. W., van den Brand, H., van Loon, J. J. A., & van Huis, A. (2010). An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *PLoS ONE*, 5(12), 1–7.
- Parlamento Europeo, C. E. (2017). Reglamento (UE) 2017/893 DE LA COMISIÓN - de 24 de mayo de 2017 por lo que se refiere a las disposiciones sobre proteína animal transformada. 138/ (92-116).
- Pereira, S. L., Leonard, A. E., & Mukerji, P. (2003). Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 68, 97–106.
- Riddervold, M. H., Tittiger, C., Blomquist, G. J., & Borgeson, C. E. (2002). Biochemical and molecular characterization of house cricket (*Acheta domesticus*, Orthoptera: Gryllidae) $\Delta 9$ desaturase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(12), 1731–1740.
- Roos, N. (2018). Edible Insects in Sustainable Food Systems. *Edible Insects in Sustainable Food Systems*, 1–479.
- Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(5), 802–823.
- Russell A. Jurenka, David W. Stanley-Samuelson and Gary J. Blomquist a, W. L. (1988). De novo biosynthesis of arachidonic acid and 3,11,14-eicosatrienoic in the cricket *Teleogryllus commodus*. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 963, 21–27.
- Sánchez-Muros, M. J., Barroso, F. G., & Manzano-Agugliaro, F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding: A review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 16–27.
- Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233(6), 674–688.
- Simopoulos, A. P. (2016). An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, 8(3), 1–17.
- Smith, R., & Barnes, E. (2015). PROteINSECT determining the contribution that insects can make to

- addressing the protein deficit in Europe. 1–53.
- Stanley, D. (2006). Prostaglandins and other eicosanoids in insects: Biological significance. *Annual Review of Entomology*, 51, 25–44.
- Starčević, K., Gavrilović, A., Gottstein, Ž., & Mašek, T. (2017). Influence of substitution of sunflower oil by different oils on the growth, survival rate and fatty acid composition of Jamaican field cricket (*Gryllus assimilis*). *Animal Feed Science and Technology*, 228(January), 66–71.
- Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar T, Castel V, Rosales M, et al. (2006). *Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options - Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Szelei, J., Woodring, J., Goettel, M. S., Duke, G., Jousset, F. X., et al. (2011). Susceptibility of North-American and European crickets to *Acheta domesticus* densovirus (AdDNV) and associated epizootics. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(3), 394–399.
- Wang, H., Liénard, M. A., Zhao, C., Wang, C., & Löfstedt, C. (2010). Neofunctionalization in an ancestral insect desaturase lineage led to rare D 6 pheromone signals in the Chinese tussah silkworm. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(10), 742–751.
- Wrage, N., Velthof, G. L., Beusichem, M. L. Van, & Oenema, O. (2001). Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 1723–1732.
- Zárate, R., Vazdekis, J., Tejera, N., Pérez, J. A., & Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and Translational Medicine*.
- Zhou, X. R., Horne, I., Damcevski, K., Haritos, V., Green, A., et al. (2008). Isolation and functional characterization of two independently-evolved fatty acid $\Delta 12$ -desaturase genes from insects. *Insect Molecular Biology*, 17(6), 667–676.