



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Evaluación *in vivo* del grillo (*Acheta domestica*) en el control de enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad”

Presenta:

M.C. Alexandro Escobar Ortiz

Dirigido por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Co-Director:

Dr. Jaime Lizardi Mendoza

Querétaro, Qro. Junio del 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los alimentos

“Evaluación *in vivo* del grillo (*Acheta domesticus*) en el control de enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctorado en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M.C. Alexandro Escobar Ortiz

Dirigido por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Co-dirigido por:

Dr. Jaime Lizardi Mendoza

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Director

Firma

Dr. Jaime Lizardi Mendoza

Co-director

Firma

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez

Asesor

Firma

Dra. Minerva Ramos Gómez

Asesor

Firma

Dr. Diego Hernández Saavedra

Asesor:

Firma

Centro Universitario Querétaro, Qro.
México

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al gobierno de México, en especial a la Comisión Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), por la beca de manutención otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (CVU 854989). Gracias a esta oportunidad, he podido continuar mi formación profesional a través de la educación pública. Me siento inmensamente agradecido y comprometido a retribuir a la sociedad mexicana todo lo que me ha brindado.

A la Dra. Rosalía Reynoso Camacho, no hay palabras suficientes para agradecerle por su invaluable apoyo, acompañamiento, respaldo, consejos, seguimiento y dirección a lo largo de más de 8 años. Desde la licenciatura, pasando por la maestría, hasta el doctorado, usted ha sido una guía excepcional. Me siento bendecido de haber sido dirigido por una investigadora de su calibre y calidad humana.

A la Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez, mi gratitud es infinita por su gran apoyo durante mi formación. Sus asesorías, consejos y constante respaldo fueron cruciales para superar los muchos retos que se presentaron en mi proyecto de investigación. Agradezco profundamente todo el conocimiento que siempre me compartió con tanta paciencia.

A la Dra. Minerva Ramos Gómez, gracias por su apoyo y sus sabios consejos que fueron esenciales para la correcta ejecución de este proyecto.

A la Dra. Ana Angélica Feregrino, mi más sincero agradecimiento por abrirme las puertas de su laboratorio, por su constante respaldo y por su apoyo en las colaboraciones y el uso del cromatógrafo de gases.

A la Dra. Ofelia Mora Izaguirre y a la M.C. María Laura Gonzales Dávalos, gracias por su asesoría y por permitirme utilizar su laboratorio para los análisis de transcritos. Su generosidad y disposición han sido fundamentales para el desarrollo de esta tesis.

RESUMEN

El grillo *Acheta domesticus* (AD) es una alternativa alimentaria con bajo impacto ambiental en comparación con el ganado convencional. Se destaca por su alto contenido de fibra y proteína, con posibles beneficios para la salud, aunque los mecanismos exactos no han sido completamente explorados. El objetivo de esta investigación fue caracterizar los compuestos bioactivos presentes en AD y determinar sus efectos en la prevención de la obesidad y sus complicaciones, así como identificar los posibles mecanismos de acción. El análisis nutricional reveló que AD es rico en proteínas (61%) y ácidos grasos poliinsaturados (12%), siendo el ácido alfa linoleico el más abundante. También contiene minerales como K, Mn y Ca, así como ácido glucónico con alta capacidad antioxidante. En el estudio *in vivo* con ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa (DAGF), la suplementación con AD al 4 y 8% durante 16 semanas previno la ganancia de peso corporal (9 y 19%, respectivamente). Encontrándose una mejora en la resistencia a la insulina, especialmente en el grupo suplementado con 8% de AD. Además, la suplementación con AD generó cambios en el microbioma fecal de ratas con una DAGF, relacionados con un fenotipo saludable. Se observó un aumento de *Bacteroidetes* y una disminución de *Firmicutes*, comportamiento asociado con la reducción de marcadores de obesidad en otros estudios. Además, se identificaron incrementos en familias bacterianas relacionadas con un estado metabólico saludable como *Prevotellaceae* y una disminución en familias bacterianas asociadas con dietas hipercalóricas como *Clostridiaceae*, además se observaron cambios en los metabolitos microbianos, ácidos biliares y triterpenoides. A nivel inflamatorio, la suplementación con AD redujó significativamente los marcadores sistémicos, como TNF- α e IL-1 β , indicando una posible mitigación de la inflamación relacionada con la obesidad. Los resultados sugieren que la inclusión de AD en la dieta ejerce efectos positivos en la prevención de la obesidad y sus complicaciones, mediados por cambios en el microbioma y la reducción de la inflamación.

Palabras clave: *Acheta domesticus*; desórdenes metabólicos; obesidad; microbiota.

ABSTRACT

The cricket *Acheta domesticus* (AD) presents a viable food alternative with a substantially lower environmental impact compared to conventional livestock. Notable for its high fiber and protein content, AD offers potential health benefits, though the precise mechanisms underlying these effects remain underexplored. This research aimed to characterize the bioactive compounds in AD and evaluate their efficacy in preventing obesity and its associated complications, as well as to elucidate potential mechanisms of action. Nutritional analysis revealed that AD comprises 61% protein and 12% polyunsaturated fatty acids, with alpha-linolenic acid being the predominant fatty acid. AD also contains essential minerals such as potassium (K), manganese (Mn), and calcium (Ca), along with gluconic acid, which exhibits significant antioxidant capacity. In an *in vivo* study, rats fed a high-fat and high-fructose diet (HFFD) were supplemented with 4% and 8% AD over 16 weeks. This supplementation led to a significant reduction in body weight gain by 9% and 19%, respectively. Notably, insulin resistance improved markedly in the 8% AD supplemented group. Furthermore, AD supplementation induced favorable alterations in the fecal microbiome of HFFD-fed rats, aligning with a healthier phenotype. Specifically, an increase in *Bacteroidetes* and a decrease in *Firmicutes* were observed, a microbial profile correlated with reduced obesity markers. Additionally, bacterial families associated with a healthy metabolic state, such as *Prevotellaceae*, increased, while those linked to hypercaloric diets, such as *Clostridiaceae*, decreased. Changes in microbial metabolites, bile acids, and triterpenoids were also noted. On an inflammatory level, AD supplementation significantly lowered systemic markers like TNF- α and IL-1 β , suggesting a potential reduction in obesity-related inflammation. These findings imply that incorporating AD into the diet exerts beneficial effects on obesity prevention and its complications, mediated through microbiome modulation and inflammation reduction.

Keywords: *Acheta domesticus*; metabolic disorders; obesity; microbiota.

Índice general.....	vi
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
Índice de figuras.....	x
Índice de cuadros.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Obesidad y sus complicaciones.....	3
2.1.1 Esteatosis hepática no alcohólica (EHNA).....	4
2.1.2 Resistencia a la insulina e inflamación	5
2.1.3 Microbiota intestinal: mediador entre la dieta, la inflamación y la resistencia a la insulina.....	6
2.1.4 Dieta y su efecto en el microbiota intestinal como posible tratamiento de la resistencia a la insulina.	8
2.2 Insectos comestibles una alternativa para una alimentación más sostenible	9
2.2.1. Contenido de proteínas	10
2.2.2. Contenido de lípidos.....	10
2.2.3 Contenido de carbohidratos.....	11
2.2.4 Micronutrientes presentes en AD.....	11
2.3. Compuestos en insectos con beneficios a la salud.....	11
2.3.1. Compuestos fenólicos	12
2.3.2. Péptidos	12
2.3.2.1 Capacidad antioxidante	12
2.3.2.2 Inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV)	13
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVOS.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1 Obtención de la muestra	22
6.2 Caracterización nutrimental y compuestos bioactivos de la harina de <i>Acheta domesticus</i>	22
6.2.1 Contenido nutrimental	22
6.2.2 Contenido mineral	22
6.2.3 Perfil de ácidos grasos	23
6.2.4 Perfil de metabolitos de bajo peso molecular.....	23
6.2.5 Extracción y caracterización de proteínas	24

6.3 Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de la harina AD	25
6.4 Evaluación de la harina de AD en el control de la obesidad y sus complicaciones .	26
6.4.1 Curva de tolerancia oral a la glucosa (OGTT).....	28
6.4.2 Sacrificio y obtención de muestras	28
6.4.3 Análisis histológicos del hígado y tejido adiposo	29
6.4.4 Determinación de triglicérido, HDL-c, colesterol total y ácido úrico.....	29
6.4.5 Resistencia a la insulina	29
6.5. Mecanismos de acción	29
6.5.1. Cuantificación de triglicéridos de hígado y tejido adiposo	29
6.5.2. Lípidos totales en heces.....	30
6.5.3 Inhibición de la lipasa pancreática <i>in vitro</i>	30
6.5.4 Cuantificación MDA en suero, compuestos polifenólicos totales y capacidades antioxidantes en suero.	31
6.6 Determinación de perfil de citocinas en suero.....	32
6.7 Análisis de la microbiota fecal.....	32
6.8 Análisis metabólico en contenido intestinal.....	33
6.9 Análisis estadístico.....	35
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
7.1 Composición nutrimental y compuestos bioactivos de la harina de <i>Acheta domesticus</i>	36
7.1.2 Perfil y contenido de ácidos grasos	36
7.1.3 Contenido de fibra y quitina	38
7.1.3 Contenido de minerales.....	39
7.1.4 Perfil de metabolitos.....	40
7.1.5 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la harina de <i>Acheta domesticus</i>	42
7.1.6 Determinación de punto isoeléctrico de proteínas de AD.....	46
7.2. Efecto de dietas suplementadas con harina de AD en un modelo de obesidad	50
7.2.1. Peso corporal y el peso relativo del tejido adiposo blanco	50
7.2.2. Tamaño de adipocitos y triglicéridos en el tejido adiposo mesentérico.	53
7.2.3. Perfil lipídico	56
7.2.4 Intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina.	59
7.2.5 Hígado graso no alcohólico	65
7.3. Compuestos fenólicos y niveles de MDA en suero	68
7.4 Análisis de la microbiota fecal de ratas alimentadas con una dieta alta	71

en grasa y fructosa y suplementada con <i>Acheta domesticus</i>	71
7.4.1. Alfa y beta diversidad de la microbiota fecal.....	71
7.4.2 Abundancia relativa a nivel taxonómico de filo de la microbiota fecal	76
7.5 Análisis metabólico del contenido intestinal de ratas alimentadas con una DAGF y <i>Acheta domesticus</i>	87
8. CONCLUSIONES	111

Índice de figuras

Figura 1. Capacidad antioxidante de los péptidos obtenidos de la hidrólisis digestiva de proteínas de insectos comestibles (Adaptado de Zielińska et al., 2017).....	14
Figura 2. Metodología para la extracción de proteínas y carbohidratos a partir de AD.	25
Figura 3. Modelo in vivo de la evaluación de <i>Acheta domesticus</i> sobre la prevención de obesidad.	27
Figura 4. Compuestos fenólicos totales de extractos de <i>Acheta domesticus</i> , obtenidos con mezclas de etanol agua en diferentes proporciones.	43
Figura 5. Capacidad antioxidante evaluada con el radical ABTS de extractos de <i>Acheta domesticus</i> , obtenidos con diferentes mezclas de etanol agua.	43
Figura 6. Capacidad antioxidante medida por el radical DPPH de extractos de <i>Acheta domesticus</i> , obtenidos con mezclas de etanol agua en diferentes proporciones.....	45
Figura 7. Proteína de harina de <i>Acheta domesticus</i> solubilizada a diferentes pH (1-12)	47
Figura 8. Rendimiento de extracción de proteína a diferentes pH (1 – 12) a partir de harina de <i>Acheta domesticus</i>	48
Figura 9. Rendimiento de extracción de proteína de <i>Acheta domesticus</i> con diferentes procesos térmicos, a pH 10.	49
Figura 10. Efecto del consumo de una DAGF suplementada con la harina de <i>Acheta domesticus</i> sobre la morfología de los adipocitos (A) y el contenido de triglicéridos en el tejido adiposo mesentérico (B).	54
Figura 11. Efecto de la suplementación de la harina de <i>Acheta domesticus</i> en una DAGF sobre los lípidos totales en heces.....	55
Figura 12. Efecto de la suplementación de harina de <i>Acheta domesticus</i> en una DAGF sobre triglicéridos en suero (A); colesterol total en suero (B); HDL-c en suero (C) y TAG/HDL-c (D).	57
Figura 13. Efecto del consumo de la DAGF suplementada con harina de grillo al 4 y 8 % durante 16 semanas sobre la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) (A) y área bajo la curva correspondiente a la OGTT (B). Valores de glucosa en sangre durante la OGTT y restando el nivel basal de glucosa (C) y área incremental bajo la curva (D).....	61
Figura 14. Efecto de la suplementación de harina de <i>Acheta domesticus</i> sobre parámetros de resistencia a la insulina. Insulina en ayunas (A). Glucosa en ayunas (B). Índice HOMA-IR (C).....	64

Figura 15. Efecto de la inclusión de (<i>Acheta domesticus</i>) en una DAGF sobre la acumulación de gotas lipídicas en tejido hepático (A), acumulación de triglicéridos en hígado (B) y ácido úrico en suero (C).....	67
Figura 16. Efecto de la suplementación de la harina de <i>Acheta domesticus</i> sobre compuestos fenólicos totales en suero (A) Capacidad antioxidante en suero medida por ABTS y DPPH (B y C). MDA en suero (D). Actividad de la Súper Óxido Dismutasa (E).	70
Figura 17. Microbiota fecal de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y en fructosa y suplementada con <i>Acheta domesticus</i> (AD) al 4 y al 8 %. Curvas de rarefacción (A). Especies observadas (B). índice de Simpson (C). Shannon (D). Índice de Fisher (E).	74
Figura 18. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la beta diversidad por distancias de Bray-Curtis de la microbiota fecal de ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y fructosa (DAGF) y suplementadas con 4 y 8 % de <i>Acheta domesticus</i> (AD).....	76
Figura 19. Abundancia relativa a nivel de filo de la microbiota fecal de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y fructosa (DAGF) y suplementadas con 4 y 8% de AD (A). Abundancia de los filos Firmicutes (B) y Bacteroidetes (C).	80
Figura 20. Análisis Lefse (LDA Effect size) a nivel familia de la microbiota fecal de ratas alimentadas con una DAGF suplementada con <i>Acheta domesticus</i> (AD) al 4 y 8%.	82
Figura 21. Abundancia relativa de familias de la microbiota fecal de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y fructosa (DAGF) y suplementadas con 4 y 8% de AD.	83
Figura 22. Heatmap de análisis de agrupamientos de correlaciones de familias bacterianas en heces de ratas alimentadas con una DAGF suplementada con AD al 4 y al 8% y parámetros metabólicos asociados a la obesidad.....	86
Figura 23. Diagramas de caja y gráficas de densidad de compuestos encontrados en análisis metabólico en el colon antes y después de filtrar, normalizar y escalar los datos.	88
Figura 24. Análisis de componentes principales (PCA) de los metabolitos del contenido intestinal de ratas alimentadas con una DAGF y suplementada con <i>Acheta domesticus</i> (AD) al 4 y 8%.	89
Figura 25. Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) del metaboloma derivado del contenido intestinal de ratas alimentadas con una DAGF y suplementada con <i>Acheta domesticus</i> (AD) al 4 y 8 % (A). Importancia de la variable en el PLS-DA (VIP score) responsable de la discriminación y sus puntuaciones para los componentes 1 (B) y 2 (C).	92
Figura 26. Área relativa de las cuatro principales variables responsables de la discriminación en el PLS-DA del metaboloma obtenido del contenido intestinal de	

ratas alimentadas con una DAGF y suplementada con <i>Acheta domesticus</i> (AD) al 4 y 8 %.	94
Figura 27. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales dispersos (sPLSDA) del metaboloma obtenido del contenido intestinal de ratas alimentadas con una DAGF y suplementada con <i>Acheta domesticus</i> (AD) al 4 y 8 % (A). Importancia de la variable en el sPLS-DA (VIP score) responsables de la discriminación y sus puntuaciones para los componentes 1 (B) y 2 (C).....	95
Figura 28. Volcan plot de metabolitos y su poder de discriminación por la prueba de Kruskal-Wallis, del metaboloma obtenido del contenido intestinal de ratas alimentadas con una DAGF suplementada con <i>Acheta domesticus</i> (AD) al 4 y 8 %.	96
Figura 29. Área relativa de los principales metabolitos con una mayor diferencia estadística significativa entre los 4 tratamientos experimentales del metaboloma obtenido del contenido intestinal de ratas alimentadas con una DAGF suplementada con <i>Acheta domesticus</i> (AD) al 4 y 8 %. Las barras indican la media \pm desviación estándar (n = 6).	98
Figura 30. Perfil de citosinas inflamatorias y antiinflamatorias en suero de ratas alimentadas con una DAGF suplementada con 4 y 8 % de <i>Acheta domesticus</i> . 106	
Figura 31. Análisis de correlación de Pearson entre las concentraciones séricas de IL-1 β y la abundancia relativa de las familias bacterianas Rikenellaceae A), Bacteroidaceae B) y Prevotellaceae C).....	108
Figura 32. Análisis de correlación de Pearson entre las concentraciones séricas de IL-1 β y la como la AUC de la OGTT A), Peso del tejido adiposo blanco B), Peso del tejido adiposo visceral C), Glucosa sérica D) y Triglicéridos en suero E).....	110

Índice de cuadros.

Cuadro 1. Composición nutrimental de las dietas experimentales utilizadas en el estudio in vivo.....	28
Cuadro 2. Caracterización nutrimental y antioxidante de <i>Acheta domesticus</i>	37
Cuadro 3. Perfil de ácidos grasos de <i>Acheta domesticus</i>	38
Cuadro 4. Contenido de minerales de <i>Acheta domesticus</i>	39
Cuadro 5. Perfil de metabolitos de bajo peso molecular de <i>Acheta domesticus</i> ..	41
Cuadro 6. Efecto del consumo de una DAGF la suplementación de <i>Acheta domesticus</i> en sobre la ganancia de peso, consumo de alimento, índice de masa corporal y peso relativo de los tejidos adiposos blancos en ratas Wistar.	51
Cuadro 7. Metabolitos identificados de manera putativa en contenido cecal.	102
Cuadro 8. Abundancia normalizada de metabolitos identificados en el contenido cecal de ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y fructosa (DAGF) y suplementadas con 4 y 8% de <i>Acheta domesticus</i> (AD).	104

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial existen grandes desafíos en la producción de alimentos debido al incremento de la población, la cual se estima que alcance 9.15 mil millones de personas en el 2050, lo que representa un reto para las cadenas de producción de alimentos y para el medio ambiente. Una alternativa más sustentable en la producción de alimentos son los insectos comestibles, ya que su producción genera menos emisiones contaminantes, requiere menos espacio y menor cantidad de alimento y agua (Oonincx et al., 2020). Entre las especies de insectos comestibles destaca el grillo *Acheta domesticus* (AD) por su contenido nutrimental, el cual se caracteriza por su elevado contenido de proteínas, fibra, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas y minerales (Oonincx et al., 2020; Escobar-Ortiz et al., 2021).

El interés por el consumo de los insectos comestibles se debe en gran medida a sus propiedades bioactivas (Hwang et al., 2019). En los insectos comestibles se ha destacado su contenido de proteínas y polisacáridos (Sipponen et al., 2018). Para hidrolizados proteicos de *Grylodes sigillatus*, estudios *in vitro* han demostrado un efecto inhibitorio de la enzima convertidora de angiotensina, capacidades antioxidantes e inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) relacionada con la secreción de insulina (Hall et al., 2018).

Por otro lado, se ha reportado que el consumo de *Grylodes sigillatus* disminuyó la proteína inflamatoria TNF-alfa en plasma de individuos sanos en un estudio de intervención (Stull et al., 2018). A pesar que la inflamación puede estar asociada a gran variedad de patologías e infecciones, una de las causas de la inflamación crónica de bajo grado es la obesidad, por lo que sería interesante evaluar el efecto protector del consumo de insectos comestibles en la obesidad y sus complicaciones.

La especie de grillo *Acheta domesticus* es la especie de insecto comestible de mayor relevancia económica a nivel mundial. Sin embargo, a pesar de su contenido nutrimental que podría sugerir que su consumo tiene efectos benéficos en la

prevención de enfermedades metabólicas, sus beneficios relacionados con el efecto protector contra la obesidad y sus complicaciones han sido poco estudiados. Recientemente se reportó que la suplementación de una mezcla de cacao, harina de grillo de la especie *Acheta domesticus* y de nopal puede reducir el peso corporal, la masa grasa y la acumulación de lípidos en el hígado de los ratones obesos. Sin embargo, mecanismos relacionados con el efecto de AD sobre la inflamación o cambios metabólicos de la microbiota no fueron evaluados, lo que representa una área de oportunidad de estudio. Adicionalmente, en este estudio no fue posible identificar el efecto directamente de AD ya que el nopal tiene efectos benéficos en la obesidad y se desconoce si la adición de AD en la mezcla aporta un efecto benéfico (Rosas-Campos et al., 2022).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto protector de AD en la prevención de obesidad y sus complicaciones; así como, la capacidad de AD de generar cambios en las poblaciones bacterianas intestinales, que se relacionen con un fenotipo saludable e identificar los posibles compuestos bacterianos asociados a los beneficios anteriormente mencionados.

2. ANTECEDENTES

2.1 Obesidad y sus complicaciones

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por un crecimiento excesivo de los depósitos de tejido adiposo y la acumulación de grasa en el cuerpo. Esta condición se ha convertido en una preocupación global de salud, afectando a individuos de todas las edades. A nivel mundial, su prevalencia se ha triplicado en la última media década (Blüher et al., 2019).

Numerosos reportes han establecido una relación correlación entre la obesidad y la prevalencia de enfermedades no comunicables como hipertensión, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y algunos tipos de cáncer (Lustig et al., 2022).

La función principal del tejido adiposo blanco es almacenar energía en forma de grasa (triglicéridos). Cuando la ingesta de energía supera el gasto energético, aumenta el número de adipocitos (hiperplasia) y su tamaño (hipertrofia), lo que conduce a la obesidad en el tejido adiposo blanco. El tejido adiposo también realiza diversas funciones adicionales, como la síntesis de hormonas, la producción de adipocinas y la modulación inmunológica, sin embargo, estas actividades están influenciadas por el tipo de tejido adiposo. Existen 3 diferentes depósitos de grasa en el cuerpo de tejido adiposo blanco, los cuales tienen efecto en el desarrollo de enfermedades metabólicas, estos depósitos de grasa responden de distinta manera a las señales de diferenciación (Lustig et al., 2022). El 80% del tejido adiposo corporal se encuentra bajo la piel (tejido adiposo subcutáneo) y el 20% restante alrededor de los órganos digestivos (tejido adiposo mesentérico y ectópico) (Al-Mansoori et al., 2022).

El tejido adiposo subcutáneo (TAS), el más grande de los depósitos de grasa, se drena hacia la circulación sistémica, lo que diluye las citocinas derivadas del TAS en comparación con los depósitos de grasa visceral que drenan hacia la circulación portal directamente al hígado. Aunque el exceso de TAS puede aumentar los niveles de citocinas y predisponer a enfermedades metabólicas, se requiere una cantidad relativamente grande de TAS antes de que aparezca la disfunción metabólica

(aproximadamente 10 kg), El TAS está menos relacionado con el desarrollo de inflamación sistémica, en comparación con el TAV. Estudios en pacientes con liposucción del TAS no manifestaron una mejora metabólica (Mohammed et al., 2008; Torre et al., 2018).

Por otro lado, el tejido adiposo visceral (TAV) es el más vascularizado, además, tiene más actividad celular y metabólica que el TAS y drena hacia la circulación portal. Un incremento de 2 kg del TAV puede aumentar los niveles de citocinas en la vena porta, lo que lleva a una mayor resistencia a la insulina hepática y un mayor riesgo de diabetes tipo 2 (Lustig et al., 2022).

Otro tipo de tejido adiposo es el tejido adiposo ectópico. El exceso de grasa ectópica en el hígado y los músculos está asociado con disfunción metabólica, siendo la grasa hepática la más perjudicial para la salud metabólica. La acumulación de 250 g de grasa ectópica hepática en niños incrementa la resistencia a la insulina. El incremento de grasa ectópica puede llevar a enfermedades como esteatosis hepática no alcohólica, cirrosis y cáncer de hígado (Lustig et al., 2022).

2.1.1 Esteatosis hepática no alcohólica (EHNA)

La esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD, por sus siglas en inglés) es una de las causas más comunes de enfermedades hepáticas y se reconoce cuando más del 5% del peso del hígado corresponde a grasa. La EHNA incluye desde la esteatosis simple, hasta fibrosis y cirrosis y se considera como la manifestación hepática del síndrome metabólico. Debido a que la EHNA es una enfermedad metabólica, recientemente ha sido renombrada como enfermedad de hígado graso asociado a disfunciones metabólicas (MAFLD, por sus siglas en inglés) (Adams et al., 2016; Eslam et al., 2020).

Adicionalmente, respecto al desarrollo y progresión de MAFLD, se ha demostrado que las alteraciones en el metabolismo de lípidos en el hígado son el desencadenante de esta enfermedad (Sakurai et al., 2021). Se ha reportado que el equilibrio de lípidos en el hígado depende de los ácidos grasos libres (AGL), la lipogénesis *de novo*, la captación de lipoproteínas y la degradación y oxidación de triglicéridos. Pacientes con obesidad y MAFLD tienen la siguiente composición

hepática de triglicéridos: 59% de ácidos grasos no esterificados, posiblemente provenientes de la lipólisis del tejido adiposo, el 26% de la lipogénesis *de novo* y el 15% de la dieta. Lo anterior sugiere que los ácidos grasos no esterificados son el principal contribuyente de los triglicéridos hepáticos en EHNA (Sakurai et al., 2021).

Por otro lado, de acuerdo con el meta análisis reportado por Younossi y colaboradores (2016), las comorbilidades metabólicas que se correlacionaron con la prevalencia de MAFLD son la obesidad (51.34%), la diabetes tipo 2 (22.51%), la dislipidemia (69.16%), la hipertensión (39.34%) y el síndrome metabólico (42.54%). Otros autores han reportado que el 70% de las personas con sobrepeso y al 90% de las personas con obesidad mórbida presentan MAFLD (Nassir et al., 2022). Respecto al desarrollo de MAFLD, uno de los factores con mayor impacto es la resistencia a la insulina (Prasun et al., 2021).

2.1.2 Resistencia a la insulina e inflamación

La resistencia a la insulina es una consecuencia de la acción deteriorada de la insulina en órganos y tejidos metabólicamente activos, como el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo. La resistencia a la insulina es un precursor en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. En un estado de obesidad, la acumulación de lípidos en el tejido adiposo blanco se incrementa, lo que genera un aumento en la secreción de citosinas pro inflamatorias como interleucina (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), provenientes de los macrófagos de este tejido, lo que contribuye a la resistencia sistémica de la insulina, disminuyendo la cascada de señalización de esta hormona en tejidos como músculo, tejido adiposo e hígado. Una acumulación de diacilglicéridos provenientes de la hidrólisis de triglicéridos en músculo e hígado muestra una fuerte relación con la resistencia a la insulina en estos tejidos; afectando negativamente la transducción de señal de la insulina (Hardy et al., 2012).

Esta falta de respuesta a la insulina está relacionada con la inflamación. Una de las teorías más aceptadas relacionada la inflamación como un agente causal de la resistencia a la insulina en la obesidad. Evidencia demuestra que en individuos obesos existen más prevalencia de marcadores inflamatorios, como el factor de

necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). El tejido adiposo blanco es el principal sitio donde la inflamación se inicia y se exagera en un estado de obesidad, generando señales que inician respuestas inflamatorias. Estas respuestas inflamatorias convergen en vías como la Cinasa c-Jun N-terminal (JNK) y NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). Las activaciones de estas vías de señalización promueven la infiltración de monocitos en el tejido adiposo y su posterior diferenciación en macrófagos pro inflamatorios M1. Los macrófagos infiltrados promueven la secreción de más citosinas proinflamatorias que promueven la inflamación sistémica y afectan la señalización de la insulina. Las citosinas proinflamatorias como TNF α e IL-1 β pueden activar vías como IKK/NF- κ B, lo que puede contribuir a la resistencia a la insulina en músculo, tejido adiposo e hígado, mediante la fosforilación de serina del sustrato del receptor de insulina IRS-1 mediada por IKK, a su vez se inhiben las fosforilación de tirosina inducida por insulina y su posterior cascada de señalización (Wu et al., 2020).

Kochumon y colaboradores (2020) reportaron una asociación de la expresión de IL-2 en el tejido adiposo y resistencia a la insulina en individuos con sobrepeso/obesidad, encontrándose que la expresión de ARNm de IL-2 en individuos correlacionó positivamente con el IMC y con los niveles de glucosa y triglicéridos en ayunas.

Uno de los factores que se han relacionado con la exacerbación de la inflamación en individuos obesos es la disbiosis intestinal generada por cambios en la microbiota.

2.1.3 Microbiota intestinal: mediador entre la dieta, la inflamación y la resistencia a la insulina.

La microbiota intestinal consiste en trillones de bacterias que residen principalmente en el colon distal. Los filos microbianos presentes en el intestino más importantes en relación a su abundancia son *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia*; los dos primeros filos representan alrededor del 90% de las bacterias intestinales (Hehemann et al., 2010). La composición de la microbiota permanece en constante fluctuación debido

a cambios en la dieta, el ejercicio, el estrés o a la exposición a antibióticos. Cambios en la abundancia de filos bacterianos como *Firmicutes* y *Bacteroidetes* se han relacionado con el incremento de la permeabilidad intestinal y, en consecuencia, al aumento de la expresión de citosinas inflamatorias en suero (Lee et al., 2020). Esto se debe a que los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de las bacterias Gram negativas pueden translocarse a través de la barrera intestinal y causar una inflamación sistémica, coadyuvando en el desarrollo de resistencia a la insulina (Di Lorenzo et al., 2019).

Numerosas evidencias han sugerido una relación causal entre la disbiosis de la microbiota y diversas enfermedades humanas, como la obesidad y la diabetes tipo 2. Por ejemplo, al comparar individuos con obesidad y individuos con un peso normal, estos los sujetos obesos se caracterizan por tener una reducción en la diversidad de su microbiota y una disminución de su riqueza (número de diferentes bacterias presentes) (Aron-Wisnewsky et al., 2019).

La microbiota también puede estar relacionada con beneficios a la salud; por ejemplo, los metabolitos de la microbiota intestinal son capaces de modular el sistema inmunológico del huésped. Por ejemplo, el butirato induce la expresión del factor de crecimiento transformante (TGF β) en células epiteliales intestinales humanas, activando a su vez, a las células T reguladoras antiinflamatorias (Ilhan et al., 2017; Lee et al., 2020). También estos microorganismos contribuyen a la salud e integridad de la barrera intestinal humana. Por ejemplo, *Akkermansia muciniphila*, una bacteria que degrada mucina desempeña un papel en el mantenimiento de la salud de la barrera intestinal humana al modular la translocación de moléculas microbianas a través del intestino (Everard et al., 2013; Lee et al., 2020).

Géneros bacterianos que incluyen *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Roseburia*, *Akkermansia*, *Faecalibacterium* y *Prevotella* se han reportado que son más abundantes en individuos con un estado saludable (Gurung et al., 2020). Dichos géneros se han correlacionado con la mejora en la barrera intestinal y la disminución de la inflamación. El género *Prevotella* se ha correlacionado en la mejora de la resistencia a la insulina. En un estudio con ratones, la abundancia de

Prevotella aumentó después del consumo de pan de cebada con alto contenido de fibra y la abundancia de este género se correlacionó positivamente con menores niveles de glucosa (Kovatcheva-Datchary et al., 2015).

2.1.4 Dieta y su efecto en el microbiota intestinal como posible tratamiento de la resistencia a la insulina.

Numerosos estudios han evaluado el efecto de las intervenciones dietéticas y su relación con la microbiota intestinal como tratamiento de la resistencia a la insulina. De acuerdo al meta análisis elaborado por Ojo y colaboradores (2021), los individuos que consumen una dieta alta en fibra, incrementaron 0.73 veces la abundancia de *Bifidobacterium*, redujeron 0.45 veces los niveles de lipopolisacáridos en suero, así como los niveles de la proteína C reactiva, además se mostró una disminución del 0.57 veces en el índice de masa corporal.

La dieta mediterránea produce cambios en la microbiota intestinal como disminución de la abundancia relativa de *Firmicutes* y *Ruminococcus* y incremento de *Bacteroidetes* y *Prevotella* (García-Mantrana et al., 2018; Ghorbani et al., 2021).

Otro estudio en sujetos obesos y con sobrepeso mostró que una dieta enriquecida con sardinas (100 g diarios durante 5 días a la semana, durante 6 meses) mostró una reducción del ratio de la abundancia *Firmicutes/Bacteroidetes* e incremento de la abundancia del género *Prevotella* después de 6 meses, con una mejora en el modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR) comparado con el grupo control (Balfegó et al., 2016).

Se ha reportado que una dieta alta en vegetales y carbohidratos no digeribles tiene efectos benéficos en la microbiota intestinal y la resistencia a la insulina, a través de la modulación de la inflamación. Así lo demuestra el reporte de Kim y colaboradores (2013) quienes realizaron un estudio en 6 individuos con un IMC mayor a 25 y diagnosticados con diabetes tipo 2 y hipertensión. Los participantes consumieron una dieta vegetariana (42 g de fibra dietaria al día durante un mes y después de esta intervención dietética se encontró una disminución en sus índice de masa corporal, niveles de hemoglobina glicosilada, glucosa postprandial y colesterol total. Además, estos individuos incrementaron la

diversidad bacteriana de su microbiota intestinal, mostrando una reducción del filo *Firmicutes* y un incremento del filo *Bacteroidetes*, también disminuyó sus niveles de inflamación intestinal.

Se ha reportado que los prebióticos son uno de los principales elementos en la dieta que pueden ayudar a disminuir la resistencia a la insulina relacionada a la inflamación y la microbiota. Los prebióticos son fibras no digeribles que pueden ser fermentadas en el intestino e inducir selectivamente la función de crecimiento de algunas bacterias (He & Shi, 2017).

Con base a esta información, se puede concluir que una dieta alta en carbohidratos no digeribles es beneficiosa para el control de la resistencia a la insulina y este efecto puede estar mediado por los cambios en la microbiota intestinal debido al efecto prebiótico de la fibra, lo que en consecuencia puede generar efectos de disminución de la inflamación sistémica y atenuar la resistencia a la insulina. Recientemente un alimento que ha tomado relevancia como propuesta son los insectos comestibles, los cuales se caracterizan por ser ricos en carbohidratos no digeribles.

2.2 Insectos comestibles una alternativa para una alimentación más sostenible

Los insectos comestibles se han recomendado como una alternativa de alimento más sostenible. La entomofagia es la práctica de comer insectos, los cuales son consumidos de manera regular por aproximadamente 2 mil millones de personas. El uso de insectos como alimento es más sostenible comparado con las granjas de producción animal, en particular cuando se considera el uso de terreno y el potencial cambio climático, debido a que la producción de insectos comestibles genera menos gases de efecto invernadero como CO₂, CH₄ y NO₂, comparados con el ganado convencional (Oonincx et al., 2020; Van Huis et al., 2020; Rivero-Pino et al., 2024).

Los grillos (*Orthoptera; Gryllidae*) se encuentran entre las especies de insectos más cultivadas. Los grillos se han criado a escala industrial en los países occidentales durante las últimas dos décadas y son consumidos por los humanos

en muchas regiones del mundo (Van Huis et al., 2020). *Acheta domesticus* L. o grillo común como se le conoce en México, es una de las especies de insectos comestibles industrializados más importantes (Siddiqui et al., 2024).

Es importante destacar que recientemente se ha evaluado la seguridad del consumo de AD por el ser humano e incluso la Comisión europea de seguridad alimentaria ha aprobado su producción y comercialización para consumo humano (Siddiqui et al., 2024).

AD tiene un uso potencial como una fuente alternativa de alimento, destacando su contenido nutrimental por la presencia de proteínas, fibra, ácidos grasos insaturados, vitaminas y minerales (Pilco-Romero et al., 2023).

2.2.1. Contenido de proteínas

Se han reportado concentraciones de proteínas en AD hasta del 74% y con una digestibilidad del 85%, siendo la globulina la fracción proteica más abundante (Ndiritu et al., 2017). Mientras que, Hammer y colaboradores (2023) reportaron una digestibilidad *in vitro* de 79 a 93% de la harina de grillo deshidratada.

Montowska y colaboradores (2019) realizaron la caracterización nutricional de harinas de AD obtenidas de diferentes proveedores en Europa y Asia, reportando un contenido de proteínas del 42.0–45.8%.

Recientemente, Urbina y colaboradores (2023) evaluaron la extracción de proteínas de AD bajo métodos alcalinos y ácidos, encontrando que con el método alcalino se lograron extracciones de proteína de AD hasta del 70%, en este extracto se identificaron proteínas como la miosina C y E, la cadena pesada de miosina (MHC), la tropomiosina, la actina y algunas enzimas como la ATP sintetasa.

2.2.2. Contenido de lípidos

En cuanto al contenido de grasas de AD, Montowska y colaboradores (2019) reportaron niveles entre 23.6–29.1%, siendo el ácido oleico, palmítico y linoleico, los ácidos grasos más abundantes en AD (Kim et al., 2016). Otros autores reportaron valores menores de grasa utilizando diversos métodos de extracción (1.6-8%), mostrando gran variabilidad de acuerdo con el método de extracción empleado,

siendo mayor el rendimiento de extracción utilizando el método de Soxhlet y el de Folch. Por otro lado, del total de los lípidos extraídos, del 0.6 al 3.5% corresponde a colesterol y el 75% a ácidos grasos insaturados. Además, se reportó al ácido eicosapentaenoico (EPA) en concentraciones de 0.62 g/100 g (Tzompa-Sosa et al., 2014).

2.2.3 Contenido de carbohidratos

Las harinas de grillo contienen aproximadamente un 10% de carbohidratos (Ayieko et al., 2016). Entre estos se incluye a la fibra, la cual representa del 2.9-6.4% de fibra insolubles y 1% de fibra soluble (Montowska et al., 2019). Los insectos contienen quitina que se concentra en el exoesqueleto y está asociada con las proteínas. Recientemente, se ha estimado que los contenidos de quitina y quitosano varían en un 4.3–7.1% y 2.4–5.8%, respectivamente (Ibitoye et al., 2018).

2.2.4 Micronutrientes presentes en AD

El consumo de grillo se ha recomendado por su contenido de micronutrientes. Montowska y colaboradores (2019) reportaron que las harinas de AD son ricas en Ca (3.14 mg/g), Mg (113 mg/g) y Fe (4.06 mg/g). También los niveles de Cu, Mn y Zn son especialmente altos; 2.33–4.51, 4.1–12.5, 12.8–21.8 µg/g de materia seca, respectivamente. Sin embargo, Ayieko y colaboradores (2016) reportaron contenidos más bajos para los minerales Cu (29.4 µg/g), Mn (58.7 µg/g) y Zn (21.8 µg/g). También se ha cuantificado otros minerales como el sodio (8,502 µg/g), potasio (9,797.5 µg/g), fósforo (331.3 µg/g) y zinc (21.8 µg/g). Además, se reportó el contenido de la vitamina A (retinol; 0.35 µg/g), vitamina B₂ (riboflavina; 6.3 µg/g), vitamina B₁ (tiamina; 15.2 µg/g) y vitamina E (331 µg/g).

Lo anterior demuestra que AD es un insecto con características nutrimentales destacables, con un contenido destacado de proteínas, vitamina B₁₂, minerales y fibra.

2.3. Compuestos en insectos con beneficios a la salud

Existe evidencia reciente que sugiere que el consumo de grillos como AD podría tener efectos beneficios a la salud. Los grillos tienen propiedades farmacológicas como capacidad antioxidante, inhibidor glicémico, inhibidor de lipasa

pancreática y efectos antiinflamatorios (Zafar et al., 2023). Los compuestos a los cuales se les han atribuido dichos beneficios son los compuestos fenólicos, proteínas y polisacáridos.

2.3.1. Compuestos fenólicos

Los grillos contienen fitoquímicos como compuestos fenólicos y flavonoides, los cuales se sugiere que provienen de su dieta (Nino et al., 2021). Se ha reportado que estos compuestos se pueden obtener de manera más eficiente al usar la extracción asistida por ultrasonido utilizando solventes a base de etanol-agua. Además, los extractos de AD; mostraron capacidad antioxidante e inhibición de la enzima lipasa pancreática *in vitro* (Del Hierro et al., 2020).

2.3.2. Péptidos

La concentración de proteínas presentes en las diferentes especies de insectos es generalmente alta (50-70 % en base seca), lo cual puede facilitar el proceso de concentración para su posterior aplicación (Tzompa-Sosa & Fogliano, 2017). Dichas proteínas han sido ampliamente estudiadas para la producción de péptidos bioactivos, los cuales son producidos de manera normal durante el proceso de digestión gastrointestinal o mediante una digestión exógena enzimática. Durante este proceso se producen pequeños fragmentos de 2-20 aminoácidos. Específicamente, de los insectos se puede obtener un amplio rango de péptidos con actividad antimicrobiana, actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina, además de actividades antioxidantes y antiinflamatorias. Sin embargo, la bioactividad de los péptidos está influenciada por parámetros como el grado de hidrólisis, la estructura del péptido, la composición de aminoácidos y el tipo de proteasa utilizada (de Castro et al., 2018).

2.3.2.1 Capacidad antioxidante

Las moléculas con capacidad antioxidante son sustancias que tienen la función de inhibir y/o reducir el daño causado por radicales libres y especies reactivas de oxígeno; las especies reactivas de oxígeno actúan sobre los lípidos de la membrana, las proteínas y el ADN y ejercen un papel importante en muchas enfermedades (Abdel-Daim et al., 2019).

Existe un interés creciente de la búsqueda de péptidos antioxidantes de insectos comestibles. De acuerdo con lo reportado por Zielińska y colaboradores (2018), diferentes proteínas de insectos comestibles se hidrolizaron mediante una digestión gastrointestinal simulada usando pepsina, un simulador de saliva y jugos intestinales (Figura 1).

En el trabajo de Hall y colaboradores (2018) se evaluó la capacidad antioxidante de hidrolizados de grillo (*Grylloides sigillatus*) con valores de hidrólisis del 15 al 85%. Los autores reportaron que los hidrolizados con un rango de hidrólisis entre el 15 al 40% presentaron valores más altos de capacidad antioxidante medida por el radical DPPH, comparados con las harinas sin hidrolizar y con las muestras con un grado de hidrólisis entre el 50 al 85% (de Castro et al., 2018).

Las proteínas son la fracción mayoritaria de la composición de los insectos comestibles como *Acheta domesticus* y estas fracciones, después de ser sometidas a procesos de hidrólisis enzimática por la digestión gastrointestinal, pueden generar péptidos los cuales muestran una importante capacidad antioxidante por lo que esta fracción puede producir un efecto protector en procesos patológicos como la diabetes, la hiperlipidemia y la esteatosis hepática, patologías en las que se involucran sistemas oxidantes. En la siguiente sección se discutirán las actividades biológicas de los péptidos obtenidos de insectos comestibles.

2.3.2.2 Inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV)

Alrededor del 50-60% de la insulina secretada después de una comida es el resultado de la respuesta de las incretinas, principalmente mediadas por el polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP) y el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), que se expresa en respuesta a la glucosa oral, en el lumen intestinal. Las incretinas, como GLP-1 y GIP, son escindidas por DPP-IV, teniendo como resultado una pérdida en la actividad insulino-trópica; mientras que, compuestos con capacidad de bloquear DPP-IV son una alternativa en tratamientos para la diabetes tipo 2 (Hall et al., 2018). De acuerdo al estudio reportado por Hall y colaboradores (2018), los hidrolizados de proteínas de grillo (*Grylloides sigillatus*) inhiben a DPP-IV hasta un 60%, después de una simulación de digestión

gastrointestinal. Los fragmentos con un grado de hidrólisis entre un 60-85% tuvieron una mayor capacidad de inhibición DPP-IV, comparado con los extractos con un 15% de hidrólisis que no mostraron ninguna inhibición de la enzima.

Por lo tanto, las proteínas que son la fracción mayoritaria del grillo, pueden ser componentes con capacidad de disminuir los niveles de glucosa en sangre.

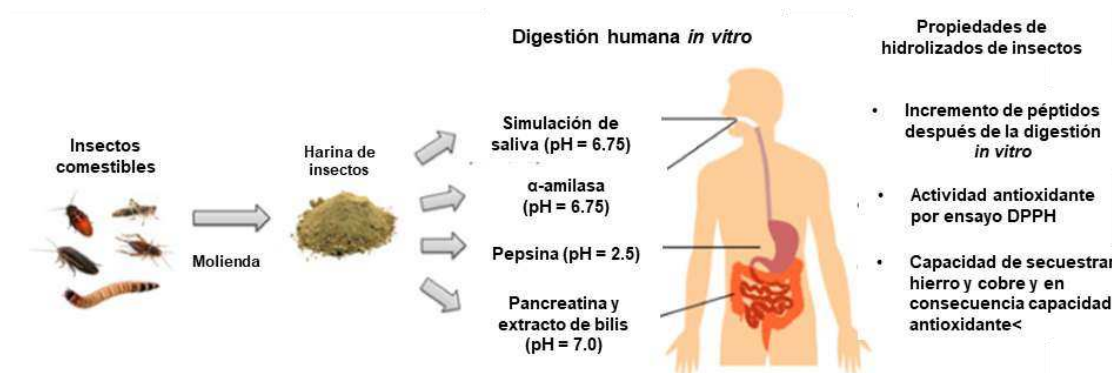


Figura 1. Capacidad antioxidante de los péptidos obtenidos de la hidrólisis digestiva de proteínas de insectos comestibles (Adaptado de Zielińska et al., 2017).

2.3.3 Polisacáridos

Reciente evidencia ha demostrado que el consumo de grillo *Grillus bismaculatus* (GB) y sus extractos puede controlar la obesidad y sus complicaciones. Estos estudios han atribuido dichos efectos a la presencia de polisacáridos como los glicosaminoglicanos (GAGs) y la quitina, los cuales se encuentran en el exoesqueleto (Ibitoye et al., 2018). El glicosaminoglicanos son un tipo de carbohidratos caracterizados por tener carga eléctrica negativa, de estructura lineal y heterogénea, generalmente son sulfatados y también son conocidos como mucopolisacáridos, con peso molecular que varía entre los 10-100 KDa (Sharma et al., 2022). Respecto a la quitina, este es un polisacárido compuesto de N-acetil-glucosamina y también se considera fibra dietética (Ibitoye et al., 2018).

Ahn y colaboradores (2015) evaluaron la suplementación de un extracto metanólico (100 y 200 mg/Kg) de GB en ratas alimentadas con la DAGF, Este tratamiento disminuyó el porcentaje de grasa abdominal y epididimal, así como el

colesterol total en suero. Además, este tratamiento mejoró los niveles del carbonilo proteico y la concentración de malondialdehído relacionados con el daño oxidativo lipídico.

Por otro lado, la suplementación del extracto de GB (200 mg/kg) en ratas con esteatosis hepática inducida con alcohol inhibió la apoptosis hepática. Además, reguló la activación de células Kupffer al inhibir la permeabilidad de endotoxinas en el intestino y su posterior translocación al hígado, sugiriendo una menor inflamación hepática y un menor daño intestinal (Hwang et al., 2019).

2.4 Consumo de grillo y su asociación con microbiota

El efecto benéfico inducido por el consumo de grillo posiblemente se puede atribuir a modulación de la microbiota intestinal y la subsecuente generación de metabolitos bacterianos. De acuerdo a lo reportado por Park y colaboradores (2020), ratas diabéticas que consumieron polvo de GB (1.63, 3.25, y 6.5 g/kg) dos veces al día, normalizaron sus parámetros de hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia, además que mejoró la intolerancia a la glucosa.

En otro estudio realizado con individuos sanos que consumieron 25 g de grillo (*Grylloides sigillatus*) por día, la bacteria probiótica *Bifidobacterium animalis* se incrementó hasta 5.7 veces en las heces de estos individuos. El consumo de grillo también se asoció con la reducción de TNF- α en plasma, el cual es un marcador de procesos inflamatorios sistémicos. Estos datos sugieren que el consumo de grillos puede mejorar la salud intestinal y reducir la inflamación sistémica (Stull et al., 2018).

Existen reportes recientes donde se demuestra que el consumo de la especie de grillo *Grylloides sigillatus* puede modular de manera positiva las poblaciones bacterianas intestinales; lo anterior se ha asociado con la presencia de quitina en los insectos. Se ha demostrado que la quitina puede inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos como *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* enteropatógena y *V. cholerae* en pruebas *in vitro*. Se ha demostrado que la ingesta de quitina puede

incrementar *Bifidobacterium animalis*, relacionada con fenotipos sanos (Benhabiles et al., 2012; Stull et al., 2018; Alessandri et al., 2019).

Otros estudios han demostrado que la quitina por la microbiota mejora la salud gastrointestinal. Según el estudio publicado por Zheng y colaboradores (2018), la suplementación con oligosacáridos de quitina en agua (1 mg/mL) puede reducir las alteraciones del síndrome metabólico causadas por una dieta alta en grasas en ratones. Los autores relacionaron estos hallazgos con una remodelación en la microbiota intestinal, una mayor expresión de proteínas de unión estrecha intestinal y una menor expresión de transcritos de citosinas inflamatorias en tejido adiposo, relacionado con una disminución de la resistencia a la insulina.

El quitosano, que es un derivado de desacetilado de la quitina y, por lo tanto, un carbohidrato más soluble, se ha relacionado con la disminución de la abundancia relativa de *Firmicutes* y un incremento en los recuentos de *Bacteroidetes*, lo que se atribuye con un menor riesgo de obesidad en humanos. A nivel género, el quitosano incrementa la abundancia relativa de los géneros *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Oscillibacter*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Alloprevotella* y *Paraprevotella* y disminuye la abundancia relativa de *Lactobacillus* (Yu et al., 2014; Guan et al., 2022).

En cuanto a los GAGs, se han evaluado algunos compuestos puros que pertenecen a esta familia como el sulfato de condroitina, el cual fue suplementado al 3% en dieta de ratones durante 4 semanas. Este produjo efectos prebióticos, ya que incrementó la presencia de bacterias reductoras de sulfato, en específico la bacteria *Desulfovibrio piger*. Además, se encontró un incremento de la presencia de H₂S en heces y el colon, una mayor expresión de GLP-1, una mayor secreción de insulina, una mejora de la tolerancia a la glucosa y menor consumo de alimentos. El H₂S es un gas bioactivo con efecto regulador producido por bacterias reductoras de sulfato en la presencia de polisacáridos altamente sulfatados como los GAG (Pichette et al., 2017).

Por lo tanto, los sustratos fermentables que llegan al intestino grueso y los metabolitos bacterianos producidos son un factor clave en el efecto de la microbiota

en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Los estudios anteriormente citados muestran cambios de la microbiota intestinal por el consumo de grillo o sus componentes, favoreciendo la abundancia relativa de bacterias que se han relacionado con una buena salud. Sin embargo, el efecto del grillo contra enfermedades metabólicas ha sido evaluado en estados saludables y no ha sido determinado en un estado metabólico alterado en modelos biológicos ni en humanos. Con base a lo anterior, en este proyecto se planteó evaluar el efecto de AD en el control de la obesidad y sus complicaciones y determinar sus posibles mecanismos de acción, incluyendo las modificaciones de la microbiota en un modelo alimentado con una DAGF.

3. JUSTIFICACIÓN

El consumo de insectos comestibles ha incrementado a nivel mundial y en 120 países se resalta su importancia como fuente alimentaria emergente. Este fenómeno se debe, en parte, a los beneficios medioambientales que ofrecen, ya que la producción de insectos requiere menos recursos y emite menos gases de efecto invernadero que la producción convencional de proteínas animales (Oonincx et al., 2020). En este contexto, el grillo AD destaca por su contenido nutricional; además, posee propiedades farmacológicas de las que sobresalen la capacidad antioxidante, la inhibición glicémica y la inhibición de lipasa pancreática (Oonincx et al., 2020; Escobar-Ortiz et al., 2021). Asimismo, AD contiene fitoquímicos como compuestos fenólicos y flavonoides, presumiblemente derivados de su dieta (Nino et al., 2021).

Previamente, se ha informado que el consumo de grillos modula positivamente la microbiota intestinal, asociado a la presencia de quitina (Stull et al., 2018). Adicionalmente, se reportó que la fermentación de la quitina por la microbiota intestinal mejora la salud gastrointestinal y puede reducir alteraciones del síndrome metabólico inducidas por una dieta alta en grasas (Zheng et al., 2018). Dada la importancia de los sustratos fermentables que alcanzan el intestino grueso y los metabolitos bacterianos producidos, se destaca la influencia crucial de la microbiota intestinal en el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

Por lo tanto, el propósito del presente trabajo fue generar información sobre la composición nutrimental de AD y determinar sus beneficios en el control de la obesidad y sus alteraciones metabólicas.

A partir de lo anterior, esta investigación relaciona el efecto del consumo de AD con la microbiota intestinal, los metabolitos del colon y la inflamación sistémica en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y fructosa. A partir de la suplementación con harina de grillo en concentraciones al 4 y 8% durante 16 semanas. Esta investigación es relevante ya que, permitió comprender de manera integral los efectos de la suplementación con grillo en la salud metabólica y gastrointestinal, proporcionando así información valiosa sobre el potencial impacto beneficioso de los insectos comestibles en la dieta humana.

4. HIPÓTESIS

El consumo de *Acheta domesticus* previene el desarrollo de la obesidad, la hipertrigliceridemia, la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática no alcohólica, debido a su contenido de proteínas y carbohidratos complejos, los cuales son hidrolizados en el sistema gastrointestinal produciendo péptidos con actividad biológica, por lo que, la fracción insoluble rica en polisacáridos es fermentada por la microbiota del colon incrementando las poblaciones bacterianas intestinales y los metabolitos microbianos asociados a un fenotipo saludable .

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar el contenido nutrimental y los compuestos bioactivos de una harina de *Acheta domesticus* y determinar sus efectos *in vivo* sobre la prevención de la obesidad y sus alteraciones metabólicas asociadas e identificar los posibles mecanismos de acción.

Objetivos específicos

- Caracterizar el contenido nutrimental y compuestos bioactivos de la harina de *Acheta domesticus*
- Determinar el efecto de la harina de *Acheta domesticus* sobre el peso corporal, la hipertrigliceridemia, la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática utilizando ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.
- Identificar posibles mecanismos de acción para el control de la obesidad y/o sus complicaciones inducidos por el tratamiento con *Acheta domesticus*.
- Evaluar en el modelo animal las modificaciones de las comunidades bacterianas intestinales inducidas por el consumo de *Acheta domesticus*.
- Identificar los posible(s) compuestos producidos por la microbiota en los animales alimentados con *Acheta domesticus*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de la muestra

La harina de grillo (*Acheta domesticus*) se obtuvo de la empresa Agroinsect S.A de C. V. Los grillos fueron cosechados, congelados, escaldados y posteriormente fueron sometidos a un proceso de secado.

6.2 Caracterización nutrimental y compuestos bioactivos de la harina de *Acheta domesticus*

6.2.1 Contenido nutrimental

Las determinaciones de humedad, cenizas y grasa total se realizaron según los métodos AOAC 930.15, AOAC 942.05 y AOAC 948.22, respectivamente. El contenido de nitrógeno total se determinó por el método Kjeldahl de acuerdo al método AOAC 978.02 utilizando el factor de conversión de 5.09 para calcular la concentración de proteína (Ritvanen et al., 2020). Los contenidos de fibra dietética soluble (FDS) y fibra dietética insoluble (FDI) se determinaron por un método enzimático según el método AACC 32-07.01. El contenido de carbohidratos se estimó por diferencia y el contenido de quitina se cuantificó gravimétricamente siguiendo el método reportado por Ibitoye colaboradores (2018).

6.2.2 Contenido mineral

La determinación del contenido mineral de la harina de AD se realizó en un equipo Scientific ICAP 600 (Thermo-Fisher, Waltham, MA, EE.UU.) con plasma de argón. Para lo anterior 0.1 g de muestra fue digerida con 7 mL de ácido nítrico (Baker 69.3%). Posteriormente, las muestras se filtraron (Whatman No. 42) y se aforaron a un volumen de 100 mL con agua desionizada. Finalmente, las muestras se expusieron a plasma de argón para excitar los elementos de las muestras e identificarlos a través de sus espectros de emisión característicos. La cuantificación se realizó utilizando curvas de calibración de cada elemento.

6.2.3 Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos de la AD se llevó a cabo por el método del éster metílico de ácidos grasos (FAMEs por sus siglas en inglés: Fatty Acid Methyl Esters), la derivatización se realizó siguiendo el método descrito por Sinosaki y colaboradores (2019) con reacciones alcalinas y ácidas. Se pesaron 50 mg de harina AD y se realizó una reacción alcalina añadiendo 0.4 mL de NaOH (1.25 M) en metanol. A continuación, las muestras se sonicaron durante 5 min a 40 kHz. Después, se añadieron 0.4 mL de H₂SO₄ (1.75 M) en metanol, las muestras se sonicaron durante 5 min a 40 kHz. Por último, se añadieron 0.8 mL de hexano y las muestras se agitaron en vórtex durante 30 s y se centrifugaron a 10000 g durante 5 min.

Se recolectaron los sobrenadantes y se inyectó 1 µL de cada muestra derivatizada a un cromatógrafo de gases (GC) Agilent serie 7890A (Wilmington, DE, EE.UU) acoplado a un detector de espectrómetro de masas (MS) de un solo cuadrupolo (Agilent 5975C) equipado con una fuente de ionización de impacto de electrones (EI). El flujo de gas portador (helio) se mantuvo a 1 mL/min. La temperatura del inyector se ajustó a 250 °C en modo *splitless*. Se utilizó una columna capilar HP-88 (30 m × 0.25 mm de diámetro interior × 0.25 µm). La temperatura inicial del horno fue de 50 °C y esta se mantuvo durante 1 min y se elevó a 175 °C a 15 °C por min, luego se elevó a 240 °C a 1 °C/min y se mantuvo durante 5 min. La energía EI se fijó en 70 eV y el rango de masas se fijó en m/z 50-1100. Los FAMEs se identificaron y cuantificaron por comparación con una mezcla estándares de FAMEs de 37 componentes (Supelco FAMEs Mix) y el procesamiento de los datos se realizó con el software Chemstation (Wilmington, DE, EE.UU).

6.2.4 Perfil de metabolitos de bajo peso molecular

Se preparó una solución de AD (1 mg/mL), agitándose en metanol durante 1 h, el metanol se evaporó al vacío; posteriormente, la muestra se derivatizó con 50 µL de agente derivatizante, BSTFA (N,O-bis[trimetilsilil]trifluoroacetamida) + 1% TMCS (trimetilclorosilano) y se agitó durante 2 min a temperatura ambiente. Finalmente, 1 µL de la muestra derivatizada se inyectó en un sistema GC-MS.

El sistema consistió de un cromatógrafo de gases Agilent GC Serie 7890A (Wilmington, DE, EE.UU) y un detector de MS de cuadrupolo simple Agilent (modelo 5975C), con la energía de los electrones establecida en 70 eV y el rango de masas en 50–700 m/z. Se empleó una columna capilar HP-5MS (30 m, 0.25 mm y 0.25 μ m) y un inyector split/splitless (2 mm). El inyector se fijó a 250 °C y la inyección se realizó en el modo splitless. La temperatura inicial del horno se mantuvo a 100 °C durante 1 min y se elevó a 220 °C a 6 °C/min, se mantuvo durante 1.23 min, luego se elevó a 290 °C a 10 °C/min y se elevó a 310 °C a 40 °C/min y se mantuvo durante 7.5 min. El flujo de gas (helio) se mantuvo a 1 mL/min. El espectro de masas fue comparado con la base de datos de referencia estándar del NIST (NIST 11) para identificar los metabolitos en los extractos. El contenido relativo de cada compuesto se calculó utilizando el porcentaje del área bajo la curva. El procesamiento de los datos se realizó con el software Chem-Station (Wilmington, DE, EE.UU).

6.2.5 Extracción y caracterización de proteínas

Para la extracción de proteínas y polisacáridos se emplearon las metodologías descritas por Laroche y colaboradores (2019) y la descrita por Ibitoye y colaboradores (2018). Un esquema general del proceso de extracción se presenta en la Figura 2.

Para el proceso de purificación, se colocaron 10 g de harina de AD en un cartucho de celulosa y los lípidos se extrajeron con etanol al 95 % durante 6 h. De esta primera fase se obtuvo una harina desgrasada, la cual, se utilizó para la extracción de proteína y polisacáridos insolubles. El primer paso consistió en solubilizar las proteínas de la harina de AD en una a pH 10 durante 2 h; posteriormente, las proteínas solubles se separaron del residuo mediante centrifugación. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 4.5, promoviendo la precipitación de las proteínas colocándolas en un pH cercano a su punto isoeléctrico. La solución se centrifugó separando el precipitado que se consideró el aislado proteico, el precipitado se secó a 37 °C durante 12 h.

En cuanto a la fracción rica en polisacáridos se utilizó para cuantificar el contenido de quitina, mientras que la fracción rica en proteínas empleó para evaluar parámetros como digestibilidad proteica *in vitro*.

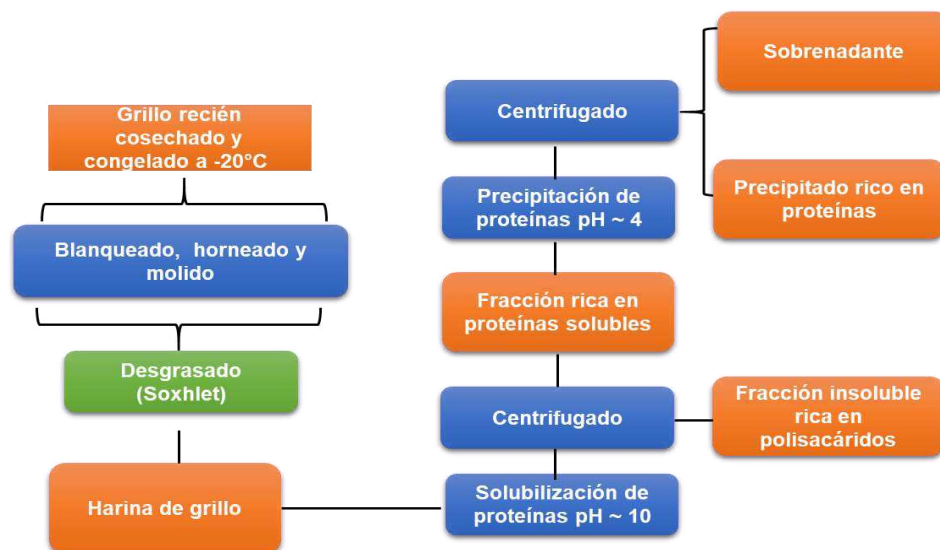


Figura 2. Metodología para la extracción de proteínas y carbohidratos a partir de AD.

6.3 Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de la harina AD

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales de la harina AD se realizó un extracto con 10 mL de agua y 1 g de harina AD; después, las muestras se centrifugaron a 10000 g. Los compuestos fenólicos totales (CFT) se cuantificaron por el método de Folin-Ciocalteu, para lo cual se mezclaron 10 µL de extractos acuosos de AD con 65 µL de agua, 37.5 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (1 N) y 187.5 µL de Na₂CO₃ (20 %). Las muestras se incubaron durante 20 min y las absorbancias se midieron a 765 nm en un lector de microplacas (Thermo-Fisher, Waltham, MA, EE.UU.). Los resultados se expresaron como mg de equivalente de ácido gálico por g de harina AD.

La capacidad antioxidante QUick, Easy, New, CHEap and Reproducible (QUENCHER) (Q-ABTS y Q-DPPH) se determinaron de acuerdo al método reportado por Del Pino-García y colaboradores (2015). Para el ensayo Q-DPPH se mezclaron siete cantidades de harina de AD (2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20 mg) con 15 mL

de solución metanólica de radical DPPH (150 μ M) y se incubaron durante 30 min en oscuridad. Las absorbancias se midieron a 517 nm en un lector de microplacas (Thermo-Fisher, Waltham, MA, EE.UU.). El radical de ensayo Q-ABTS se preparó mezclando 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio (ABTS) con 2.45 mM de persulfato de potasio y se incubó durante 12 h en la oscuridad. Posteriormente, la solución de ABTS se diluyó en metanol para obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 734 nm en un lector de microplacas (Thermo-Fisher, Waltham, MA, EE.UU.). Por último, la harina AD (2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20 mg) se mezcló con 15 mL de ABTS radical y se midieron las absorbancias a 734 nm. Los resultados de Q-ABTS y Q-DPPH se reportaron como IC_{50} .

6.4 Evaluación de la harina de AD en el control de la obesidad y sus complicaciones

Se usaron ratas macho wistar de 6 semanas de edad, adquiridas en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las ratas se sometieron a un periodo de adaptación durante una semana en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Las ratas se mantuvieron bajo un ciclo de luz y oscuridad de 12 h, las condiciones de humedad fueron de $55 \pm 15\%$ y de temperatura de 25 ± 2 °C. En el periodo de adaptación los animales tuvieron acceso libre a comida y a agua. El experimento se diseñó de acuerdo los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999. El proyecto fue sometido y aprobado al comité de bioética de la facultad de química con número de aprobación CBQ20/100 y el cuál se muestra en el anexo 1.

Se le evaluó la calidad microbiológica de la harina de AD, determinando mesófilos aerobios totales por la NOM-111-SSA1-1994, coliformes totales por la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014 y mohos y levaduras por la NOM-110-SSA1-1994.

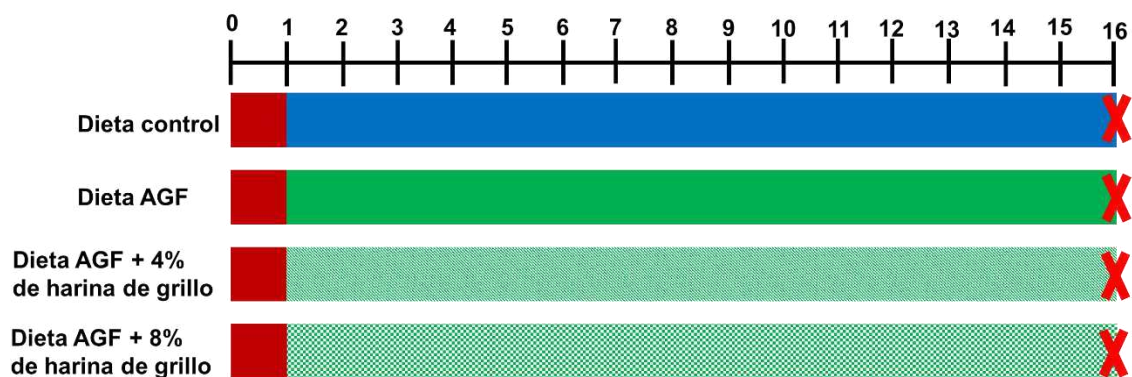


Figura 3. Modelo in vivo de la evaluación de *Acheta domesticus* sobre la prevención de obesidad.

El diseño experimental del modelo *in vivo* se muestra en la Figura 3. El experimento incluyó 4 grupos experimentales con 8 animales que se asignaron de manera aleatoria a cada grupo experimental. El grupo control sano se alimentó con una dieta estándar (Rodent Lab chow 5001). El grupo control obeso, se alimentó con una dieta alta en fructosa y alta en grasa saturada (60 % dieta estándar, 20 % de manteca de cerdo, 20 % de fructosa, 1 % de minerales y 1 % de vitaminas).

Los tratamientos con harina de grillo se alimentaron con una DAGF, suplementada con harina comercial de AD, se evaluaron 2 concentraciones de grillo en la DAGF (4 y 8%) de harina comercial de AD, que equivale a una suplementación de 15 y 30 g de harina de AD para un adulto de 70 kg, de acuerdo a los cálculos reportados por Reagan-Shaw y colaboradores (2008). La composición nutrimental de las dietas de este estudio se muestra en el cuadro 1. Semanalmente se registró el peso corporal y el consumo de alimento durante 16 semanas. Se garantizó la inocuidad microbiológica de las dietas midiendo la calidad microbiológica de la harina de grillo y siguiendo buenas practicas de higiene en la elaboración de las mismas.

Cuadro 1. Composición nutrimental de las dietas experimentales utilizadas en el estudio in vivo

Dieta experimental	Proteína	Grasa	Ceniza	Carbohidratos
Dieta estándar	23.5 ± 0.21	5.0 ± 0.36	8.0 ± 0.13	63.5 ± 1.55
DAGF	12.8 ± 0.03	23.0 ± 0.28	4.8 ± 0.04	59.4 ± 3.06
DAGF + 4 % AD	13.5 ± 0.25	22.8 ± 0.16	4.9 ± 0.05	59.0 ± 2.70
DAGF + 8 % AD	15.1 ± 0.04	22.6 ± 0.08	5.0 ± 0.21	57.1 ± 1.41

6.4.1 Curva de tolerancia oral a la glucosa (OGTT)

La prueba de tolerancia oral a la glucosa se realizó en las ratas una semana antes del sacrificio, administrando una solución de glucosa a 2 g/kg de peso corporal vía intragástrica en ayunas (8-10 horas). La sangre se obtuvo con un pequeño corte a la punta de la cola en la cual se midió la glucosa con un glucómetro (Accu-Check® Performa, Roche) al minuto 0, 30, 60, 90 y 120 después de la carga de glucosa. El área bajo la curva se calculó restando la glucosa basal en ayunas a los niveles de glucosa a los 30, 60, 90 y 120 min después de la carga de glucosa.

6.4.2 Sacrificio y obtención de muestras

Al finalizar las 16 semanas de experimentación se recolectaron muestras de heces y orina de cada animal, colocando a cada animal en una jaula metabólica con libre acceso a alimentos y agua. Los animales se sometieron a un ayuno de 8 h y posteriormente se realizó la matanza por decapitación; se recolectó la sangre en tubos vacutainer, luego se centrifugó a 2,500 g por 10 min para obtener el suero, el cual se almacenó a -80 °C. Los órganos que se recolectaron fueron hígado y tejidoS adiposo mesentérico, epididimal y retroperirenal.

Todos los órganos se lavaron con solución salina al 0.9 % y se pesaron. Posteriormente, los tejidos se seccionaron y una de las porciones del hígado y del tejido adiposo mesentérico se colocaron en formol al 10 % para análisis histológicos. La otra fracción de los órganos y las heces se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C para posteriores análisis.

6.4.3 Análisis histológicos del hígado y tejido adiposo

De las muestras de órganos que se colocaron en formol al 10 % se realizó un análisis histológico. Las muestras se fijaron en parafina y se seccionaron en láminas de 5 µm, para posteriormente ser teñidos en una solución de hematoxilina y eosina. Se realizaron fotografías de las muestras a 300x para hígado y 100x para tejido adiposo.

6.4.4 Determinación de triglicérido, HDL-c, colesterol total y ácido úrico

Los triglicéridos, colesterol total y HDL-c en suero se midieron usando kits colorimétricos enzimáticos (SpinReact, ES) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

6.4.5 Resistencia a la insulina

La glucosa en suero se cuantificó con un kit enzimático de la marca (Spinreact, ES). La cuantificación de insulina en suero se llevó a cabo con un kit de inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA) de la marca (Millipore, DE). Con los

$$\text{HOMA} = \frac{\text{Insulina} \left(\frac{\mu\text{U}}{\text{ml}} \right) * \text{Glucosa} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right)}{22.5}$$

parámetros de glucosa e insulina se determinó el índice de resistencia a la insulina HOMA (homeostatic model assessment).

6.5. Mecanismos de acción

6.5.1. Cuantificación de triglicéridos de hígado y tejido adiposo

Para la determinación de triglicéridos en hígado y tejido adiposo, los tejidos congelados se homogeneizaron adicionando 350 µL de KOH al 30 %:etanol (2:1 v/v). Posteriormente, las muestras se incubaron durante 12 h a 55 °C y se ajustaron a un volumen final de 1000 µL con etanol:agua (1:1 v/v). Las muestras se centrifugaron a 11200 g durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante se recuperó para ajustarse a un volumen final de 1200 µL. una alícuota de 200 µL Se mezcló con 215 µL de MgCl₂ a una concentración de 1 M y se incubó en un baño de hielo durante

10 min. Para finalizar, las muestras se centrifugaron a 11200 *g* durante 5 min y se recolectaron los sobrenadantes. Los triglicéridos se determinaron usando un kit enzimático-colorimétrico. Los resultados se expresaron en mg de triglicéridos por g de tejido.

6.5.2. Lípidos totales en heces

La extracción de lípidos totales en heces se realizó según el método de Kraus & Kahn (2015). Las heces se recolectaron durante un período de 24 h y se secaron en horno a 35 °C durante 12 h. Las heces molidas (200 mg) se mezclaron con 2 mL de solución salina al 0.9% y se agitaron durante 1 min, luego se añadieron 2 mL de cloroformo:metanol (2:1) y se agitaron durante 1 min. La mezcla se centrifugó a 10,000 *g*, 10 min a 25 °C y la fase inferior que contenía los lípidos extraídos se recuperó utilizando una aguja. La muestra se recolectó y se evaporó al vacío y se pesó el sedimento restante.

El contenido de lípidos totales en heces se cuantificó con la siguiente fórmula:

Porcentaje de lípidos totales en heces = (Peso de fracción lipídica/Peso de heces) x 100.

6.5.3 Inhibición de la lipasa pancreática *in vitro*

La capacidad de inhibición de la lipasa pancreática *in vitro* se evaluó utilizando proteínas de AD digeridas. La metodología de digestión se realizó de acuerdo a lo reportado por Coronado-Cáceres y colaboradores (2020). La harina de AD (1 g) se suspendió en 20 mL de agua y pepsina (12,000 U) ajustada a pH 2.0 con HCl 0.1 N y se incubó a 37 °C durante 2 h. Posteriormente, las muestras se digirieron con tripsina (300,000 U) y quimiotripsina (2,000 U) ajustadas a pH 7 con NaOH 0.1 N y se incubaron a 37 °C durante 2 h. Finalmente, las enzimas proteolíticas se inactivaron a 75 °C durante 20 min. Los hidrolizados se separaron por centrifugación a 10000 *g* durante 10 min a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes. Como control sin digerir se utilizó un extracto acuoso de AD obtenido con el mismo proceso descrito anteriormente sin añadir enzimas.

La actividad inhibidora *in vitro* de la lipasa pancreática de la solución proteica digestiva del polvo de AD y del extracto hidrosoluble se realizó siguiendo el método

descrito por Mendoza-Sanchez y colaboradores (2019). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición (%) y se utilizó orlistat (tetrahidrolipstatina) como control positivo.

6.5.4 Cuantificación MDA en suero, compuestos polifenólicos totales y capacidades antioxidantes en suero.

Los polifenoles séricos se evaluaron por el método de Folin-Ciocalteu y las capacidades antioxidantes séricas se midieron con DPPH y ABTS. Para la cuantificación se desproteinizaron las muestras de suero, el suero se mezcló con acetonitrilo (1:1 v/v) durante 2 min a 25 °C, luego se centrifugó la muestra a 9500 g, 10 min a 4 °C y se recuperó la fase superior. Para la determinación de compuestos fenólicos totales se mezclaron 10 µL de suero desproteinado con 65 µL de agua, 37.5 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (1 N) y 187.5 µL de Na₂CO₃ (20 %), y la mezcla se incubó durante 20 min. La absorbancia se midió a 765 nm en un lector de microplacas (Thermo-Fisher, Waltham, MA, EE.UU.) y el resultado se expresó como mg de equivalente de ácido gálico por mL.

Para la medición de la capacidad antioxidante en suero con el radical DPPH, se mezclaron 10 µL de suero desproteinado con 240 µL de solución metanólica de DPPH (150 µM) y se incubaron 30 min en la oscuridad. La absorbancia se midió a 517 nm y los resultados se expresaron como mg de equivalente de trolox/mL. El radical ABTS se preparó mezclando ABTS con persulfato de potasio 2.45 mM y se incubó durante 12 h en la oscuridad. Posteriormente, la solución se diluyó en metanol para obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 734 nm. Se mezclaron 10 µL de muestra con 200 µL de radical ABTS y se midió la absorbancia a 734 nm. El control se preparó con 10 µL de metanol y 200 µL de radical ABTS. Se realizó una curva de calibración con trolox.

El porcentaje de inhibición del radical ABTS y DPPH se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = ((\text{Abs control} - \text{Abs de muestra}) / \text{Abs control}) \times 100$$

La cuantificación de malonaldehído, un marcador de la peroxidación lipídica, se realizó de acuerdo a la técnica reportada por Buthia y colaboradores (2011). Se

mezclaron 100 μ L de suero con 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 30% y se centrifugó a 3000 *g* por 5 min. El sobrenadante se colectó y se mezcló con 100 μ L de ácido tiobarbitúrico al 1%; las mezclas se incubaron en agua a ebullición 30 min para posteriormente colocarse en agua con hielo durante 10 min. La absorbancia resultante se midió a 532 nm. La peroxidación lipídica se expresó como MDA sérico (nmol/mL) utilizando el coeficiente de extinción molar.

6.6 Determinación de perfil de citocinas en suero

El perfil de citocinas séricas se determinó mediante un análisis de microarreglo de citosinas Quantibody® Rat Inflammation Array 1 QAR-INF-1 de la marca RayBiotech (Norcross, GA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, las citosinas contenidas en el microarreglo fueron IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, MCP-1 y TNF- α . Para el análisis se hizo una resta del fondo de la placa, se contó con 2 controles positivos, además para la cuantificación se realizó una curva de cuantificación para las 10 citocinas.

6.7 Análisis de la microbiota fecal

Para el análisis de microbiota fecal las muestras fueron procesadas y analizadas con el servicio ZymoBIOMIC Service: Targeted Metagenomic Sequencing (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.).

Las muestras fecales de los animales en estudio se recolectaron directamente de la rata en condición postpandrial, se utilizaron tubos falcon estériles y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. El ADN se extrajo usando un kit comercial ZymoBIOMIC DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante y el ADN se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

La biblioteca de secuenciación se preparó utilizando PCR en tiempo real para controlar los ciclos y así limitar la formación de quimeras de PCR. Los productos finales de la PCR se cuantificaron con lecturas de fluorescencia de la qPCR y se agruparon en base a una molaridad igual. El resultado final de la rTM pooled library se limpió con el Select-a-Size DNA Clean & Concentrator[®] (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.) y luego se cuantificó con TapeStation (Agilent Technologies[®]

Santa Clara, CA, EE.UU.) y Qubit® (Thermo-Fisher, Waltham, MA, EE.UU.). El estándar de ADN de la comunidad microbiana ZymoBIOMIC Microbial Community DNA Standard (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.) se utilizó como control positivo para cada preparación de biblioteca dirigida. La biblioteca final se secuenció en Illumina MiSeq con un kit de reactivos v3 (600 ciclos). La secuenciación se realizó con 10% de PhiX spike-in.

Para el análisis bioinformático las secuencias únicas de los amplicones se infirieron a partir de las lecturas crudas utilizando el pipeline Dada2 (Callahan et al., 2016). Las secuencias quiméricas también fueron removidas con Dada2. La asignación de la taxonomía se realizó utilizando Uclust de Qiime v.1.9.1. La taxonomía se asignó con la base de datos de Zymo Research, 16S. La visualización de la composición, la diversidad alfa y la diversidad beta se realizaron con Qiime v.1.9.1 (Caporaso et al., 2010). La taxonomía que tiene una abundancia significativa entre los diferentes grupos se identificaron por el análisis LEfSe (Segata et al., 2011).

6.8 Análisis metabólico en contenido intestinal

Para establecer una relación entre los cambios en la microbiota y su efecto en los metabolitos que se generan por la fermentación bacteriana y su impacto en el metabolismo endógeno, se realizó un análisis metabólico no dirigido en heces y suero.

Para la extracción de los metabolitos en el contenido fecal se prepararon 50 mg de heces con 500 µl de acetonitrilo acuoso al 50 % que contenía sulfadimetoxina 5 µM y luego se sonicó durante 10 min. Se utilizó sulfadimetoxina como patrón interno para controlar el rendimiento de la preparación de muestras y el análisis de LC-MS. Se inyectó una alícuota de muestra de 5 µl en un sistema de cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) Acquity (Waters, Milford, MA, EE.UU.) y se separó en una columna BEH C18 (Waters, Milford, MA, EE.UU.). Para el análisis de muestras, se utilizaron como solución móvil agua (A), ACN y acetonitrilo (B) que contenían ácido fórmico al 0.1 %. Las muestras se analizaron mediante un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de triple cuadrupolo (QTOFMS,

Waters, Milford, MA, EE.UU.) El voltaje capilar y el voltaje del cono para la ionización por electropulverización se mantuvieron a 01 kV y 5 V, respectivamente, para la detección en modo negativo. La temperatura de la fuente y la temperatura de desolvatación se fijaron en 120 y 350 °C, respectivamente. Se empleó nitrógeno como gas de cono (50 L/h) y gas de desolvatación (800 L/h) y se usó argón como gas de colisión. Para realizar la corrección de masas, el espectrómetro de masas se calibró con una solución de formiato de sodio con una relación masa-carga (m/z) de 50-1000 y se controló mediante la inyección intermitente de leucina encefalina con una masa de $[M - H]^- = m/z 554.2615$. Los datos se procesaron en el software Unifi (Waters, Milford, MA, EE.UU.) en formato centroide.

Los datos sin procesar se adquirieron utilizando el software UNIFI (Waters Co.) y se exportaron al software Progenesis QI (Waters Co.) para su procesamiento y análisis. La alineación del tiempo de retención se llevó a cabo en comparación con las muestras de control de calidad. Para la selección del pico, el nivel de eliminación de ruido se fijó en 1:00 y la intensidad mínima se fijó en el 5% de la intensidad del pico base. Se realizó un análisis multivariado para evaluar la calidad de los QC (Quality controls) y los blancos, lo que se muestra en el Anexo 2. Se evaluó la desconvolución automática de picos para combinar moléculas idénticas en diferentes estados de carga. La normalización se llevó a cabo utilizando la abundancia total de iones. Los datos se exportaron para el análisis estadístico a través de un enfoque multivariado y se identificaron los compuestos clave en el software Progenesis QI. La identificación putativa se llevó a cabo mediante la comparación de la similitud de masa del precursor (error de masa < 5 ppm), la similitud de distribución de isótopos y la puntuación de fragmentación, en comparación con la fragmentación teórica. Se realizó un proceso de desconvolución manual donde se descartaron los picos que no tuvieran ruido, distribución isotópica o que no mostraran fragmentación. Los datos metabolómicos sin procesar se escalaron y centraron, para poder ser sometidos a análisis multivariados, como se menciona en la siguiente sección.

6.9 Análisis estadístico

Los resultados de la caracterización nutricional y los parámetros biológicos y bioquímicos del *modelo in vivo* se reportaron como la media \pm desviación estándar. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Las comparaciones entre todos los tratamientos se realizaron con la prueba de Tukey. Los datos se analizaron con el paquete estadístico utilizando el software R 3.4.

Los datos de la microbiota fecal se les realizó un análisis de coordenadas principales (PcoA), utilizando una matriz de distancia entre muestras calculada por la disimilitud de Bray-Curtis, usando variantes de secuencia de amplicón únicas (ASV). Para determinar si existen correlaciones entre los parámetros biológicos del modelo *in vivo* y los cambios en las abundancias relativas de los taxones de la microbiota fecal, se realizó un análisis de correlaciones de Pearson, el cual se graficó en un heapmap con agrupamiento, utilizando el paquete estadístico utilizando el software R 3.4.

Para los resultados de metabolómica se realizaron análisis multivariados para identificar los compuestos que discriminan las diferencias de metabolitos en los animales con diferentes dietas. Los análisis de componentes principales (PCA), mínimos cuadrados parciales discriminantes (PLS-DA), el discriminante de mínimos cuadrados parciales dispersos (sPLS-DA) y el volcán plot se realizaron utilizando la plataforma W\$M y Metaboanalyst 6.0.

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Composición nutrimental y compuestos bioactivos de la harina de *Acheta domesticus*

La harina de grillo es un alimento rico en nutrientes como proteínas, fibra, quitina, ácidos grasos poliinsaturados y otros compuestos que pueden ejercer efectos benéficos en el desarrollo de la obesidad y sus complicaciones (Lisberg et al., 2016). Por lo tanto, la primera etapa de esta investigación fue caracterizar la harina de AD.

7.1.1. Contenido de proteínas

La composición nutrimental y antioxidante de la harina de AD se presenta en el Cuadro 2. En cuanto a la proteína, la harina de AD tuvo un contenido de 56%, menor que el 64% reportado por Ribeiro y colaboradores (2019) y del 71% por Udomsil y colaboradores (2019). Es importante destacar que, cuando se determina el contenido de proteína de insectos, ésta se sobreestima, ya que cuando se cuantifica el nitrógeno total por el método de Kjendall, no se contempla solamente el nitrógeno proteico, también se determina la quitina, que es un carbohidrato nitrogenado. Para tratar de disminuir el efecto de la sobreestimación, se empleó el factor sugerido por Ritvanen y colaboradores (2020), el cual es de 5.09 para realizar la conversión de nitrógeno a proteína. Esto puede explicar el menor contenido de proteína en el presente estudio comparado por otros autores que usaron el factor de 6.25 (Ribeiro et al., 2019; Udomsil et al., 2019).

7.1.2 Perfil y contenido de ácidos grasos

En cuanto al perfil de ácidos grasos de la harina de AD, de los 37 estándares que se usaron para su cuantificación solamente se pudieron identificar 7 en la harina de AD. El perfil de lípidos de la harina de AD se caracterizó por el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (7.8 %), siendo el ácido linoleico el ácido graso mayoritario (6.69 %), también se identificaron ácidos graso omega 3 como el ácido alfa-linolénico con un 1.11%. Respecto a los ácidos grasos saturados su contenido fue de 6.69% y 3.69% para los ácidos grasos monoinsaturados (Cuadro 3).

Estos resultados son similares a lo reportado por Singh y colaboradores (2020). Udomsil y colaboradores (2019) reportaron un menor contenido de ácidos grasos poliinsaturados (1.4 %). Las diferencias en el contenido ácidos grasos entre estudios pueden explicarse por las variaciones en la dieta de cultivo del grillo y el procesamiento de la harina de AD.

Cuadro 2. Caracterización nutrimental y antioxidante de *Acheta domesticus*

	Harina de AD g/100 g	Montowska et al. (2019)	Ribeiro et al. (2019)	Udomsil et al. (2019)	Singh et al. (2020)
Proteína total	56.1 ± 0.1	44.8-45.8	64.4 ± 0.2	71.7 ± 0.5	63.7-75.2
Grasa cruda	14.3 ± 1.1	23.6-29.1	23.7 ± 0.1	10.4 ± 0.1	12-9-16.2
AGS	7.0 ± 0.2	-	-	8.14 ± 0.35	9.3-10.6
AGMS	4.3 ± 3.4	-	-	4.14 ± 0.25	5.0-5.9
AGPS	12.9 ± 0.5	-	-	1.4 ± 0.35	10.2-13.5
AGS/AGPS	0.54 ± .1	-	-	-	-
Ceniza	7.5 ± 0.3	3.6-4.3	4.9 ± 0.0	5.4 ± 0.3	4.7-11.5
Carbohidratos*	22.0 ± 1.1	19.6-21.8	-	-	-
Fibra dietética insoluble	16.6 ± 0.6	2.9-5.9	-	-	-
Fibra dietética soluble	1.3 ± 0.1	0.9-1.0	-	-	-
Fibra dietética total	17.9 ± 0.7	3.8-6.9	6.9 ± 0.2	4.6 ± 0.2	-
Quitina	6.25 ± 0.4	-	5.1 ± 0.0	-	-
CFT**	0.550 ± 0.05	-	-	-	-
ABTS IC50 (mg/g)	0.434 ± 0.02	-	-	-	-
DPPH IC50 (mg/g)	0.677 ± 0.01	-	-	-	-

* Carbohidratos calculados por diferencia. ** g equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra. AGS: Ácidos grasos saturados. AGMS: Ácidos grasos monoinsaturados. AGPS: Ácidos grasos poliinsaturados. CFT: Compuestos fenólicos totales.

Cuadro 3. Perfil de ácidos grasos de *Acheta domesticus*

Ácido graso		g/100 g
Ácido láurico	C 12:0	0.06 ± 0.01
Ácido mirístico	C 14:0	0.08 ± 0.01
Ácido palmítico	C 16:0	3.53 ± 0.16
Ácido plamitoleico	C 16:1 n6	0.10 ± 0.01
Ácido esteárico	C 18:0	2.3 ± 0.13
Ácido oleico	C18:1 n9	3.69 ± 0.23
Ácido linoleico	C 18:2 n6	6.69 ± 0.37
Ácido alfa-linolénico	C 18:3 n3	1.11 ± 0.26

De acuerdo a lo reportado por Rosqvist y colaboradores (2014), en un estudio clínico donde se suplementó en la dieta de individuos sanos, con ácidos grasos saturados, se generó una mayor acumulación de grasa en el tejido adiposo visceral y en el hígado, en comparación con aquellos individuos que se les suplementó con ácidos grasos poliinsaturados.

7.1.3 Contenido de fibra y quitina

Otro componente importante del grillo es la fibra dietética, incluida la quitina. En este estudio, la harina AD tuvo un contenido de fibra dietética total del 17.9 %, del cual el 93 % correspondió a la fibra dietética insoluble y el 7 % a fibra dietética soluble (Cuadro 2). Estos valores son similares a los reportados en estudios anteriores (Montowska et al., 2019). Sin embargo, los componentes de la fibra dietética de los insectos no han sido bien caracterizados y los métodos convencionales para determinar la fibra podrían sobreestimar su contenido en los insectos (Oonincx et al., 2020).

Se evaluó el contenido de quitina en la harina AD, la cual fue de 6.25 %, que es similar al 5.1 % reportado anteriormente por Ribeiro y colaboradores (2019). El contenido de quitina es importante ya que varios estudios han reportado que la quitina y sus derivados, como los oligosacáridos de quitina y quitosano, disminuyen el peso corporal (Huan et al., 2020; Tang et al., 2020). Además, estos compuestos disminuyen la insulina y la dislipidemia en ratones alimentados con una dieta alta

en grasa (Zheng et al., 2018). Por lo tanto, el consumo de carbohidratos complejos no digeribles como la quitina podrían producir efectos metabólicos beneficiosos para la salud.

7.1.3 Contenido de minerales

Existen reportes en la literatura que han demostrado que AD es un alimento con un alto contenido de minerales; debido a lo anterior, se realizó la caracterización de estos nutrimentos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Contenido de minerales de *Acheta domesticus*

Mineral	Contenido mg/100 g de <i>Acheta domesticus</i>	IDR (mg)	IDR
K	632.82	3750.0	17%
P	586.69	600.0	98%
Na	289.28	2100.0	14%
Mg	135.65	320.0	42%
Ca	92.19	1000.0	95%
Zn	16.72	8.0	209%
Fe	4.74	18.0	26%
Mn	3.53	2.3	153%
Cu	2.06	1.7	121%
Li	0.01	1.0	0.84%
S	325.94	-	-
Si	4.42	-	-
Sr	0.27	-	-
Ba	0.13	-	-

Se cuantificaron 14 minerales en la harina de AD, donde los mayoritarios fueron potasio, fosforo, azufre y sodio. En nuestro estudio se identificaron más elementos que lo reportado por Montowska y colaboradores (2018). Estos autores cuantificaron 8 elementos en diferentes harinas de AD que se comercializan en Europa. En nuestro trabajo, la harina de grillo presentó 40 % menos potasio, 50 % menos calcio, 22 % más magnesio y niveles muy similares de cobre, hierro y zinc a lo reportado por Montowska y colaboradores (2018). Estas diferencias se pueden atribuir a la dieta de crianza del grillo y a los tratamientos postcosecha de los

insectos, los cuales pueden tener efectos importantes en el contenido de micronutrientes de la harina de AD. Por ejemplo, en el proceso de escaldado, proceso que se realiza para disminuir la carga bacteriana, puede lixiviar gran cantidad de elementos presentes en los insectos (Baek et al., 2019).

Es destacable que 100 g de harina de AD proporcionan el 95, 26 y 42 % de la ingesta diaria recomendada (IDR) de estos micronutrientes, respectivamente. También es destacable el contenido de Zn y Mn, donde 30 g de harina proporcionan el 69 y 40% de la IDR, respectivamente. Por lo tanto, los insectos comestibles son una fuente importante de micronutrientes.

Se ha reportado que algunas fuentes de proteínas en la dieta tienen mayor potencial para atenuar el desarrollo de la obesidad. En el estudio de Liisberg y colaboradores (2016) se reportó que la caseína es la proteína más eficiente para prevenir la ganancia de peso y el incremento del tejido adiposo en ratones en una dieta hipercalórica. Por otro lado, los ratones alimentados con proteína de cerdo, pollo y res, aumentaron la masa de tejido adiposo en comparación con ratones alimentados con caseína, comparado con otras dietas hipercalóricas e isoproteicas. Los autores sugirieron que el potencial de alimentos ricos en proteínas para prevenir la ganancia de peso está relacionado con sus nutrientes complementarios como los ácidos grasos poliinsaturados y aminoácidos de cadena de ramificada. Debido al contenido de estos elementos en la harina de AD se puede sugerir que la harina de AD tiene potencial para atenuar el desarrollo de las complicaciones asociadas a la obesidad.

7.1.4 Perfil de metabolitos

El perfil de metabolitos de bajo peso (≥ 1000 Da) de un extracto polar de AD obtenido por GC-MS se presenta el Cuadro 5. El porcentaje de similitud del espectro de masas de los compuestos identificados putativamente con la base de la librería del NIST y los picos más importantes de su espectro de masas se muestran en el anexo 3. Se identificaron 22 metabolitos, de los cuales 7 correspondieron a aminoácidos, 2 carbohidratos, 2 ácidos orgánicos y 1 ácido graso. Los aminoácidos identificados incluyeron siguientes: L-leucina, L-valina, L-serina, L-treonina,

cistationina, L-prolina y L-fenilalanina; además, se encontraron 2 aminoácidos de cadena ramificada: L-leucina y L-valina.

Cuadro 5. Perfil de metabolitos de bajo peso molecular de *Acheta domesticus*

Naturaleza del compuesto	Identificación putativa*	RT (min)	Área	% Área**
Aminoácidos	L-leucina	5.22	189011593	10.53
	L-valina	6.1	174743882	9.13
	L-serina	8.8	79709569	4.47
	Treonina	9.3	82220132	4.58
	Cistationina	9.6	44626298	2.46
	Prolina	11.9	321244096	17.37
	Fenilalanina	13.8	30317562	1.66
Carbohidratos	Galactopiranósido	10.1	13382771	0.74
	Glucopianósido	10.9	31590814	1.76
Ácidos orgánicos	Ácido fosfórico	5.86	260377157	14.53
	Ácido glucónico	20.6	467551332	25.96
Ácidos grasos	Ácido cáprico	10.4	28308132	1.59
Otros	Pirimidina	8.35	55560694	3.22

* Compuestos identificados como derivados del n-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA)

** El porcentaje de área se calculó sumando el área de los compuestos identificados putativamente

Por otro lado, en el extracto se identificó que el compuesto con mayor área relativa (20 %) fue el ácido glucónico. Es destacable, que existen reportes anteriores del ácido glucónico en extractos de AD. Se sugirió que este compuesto podría formar parte en los extractos de AD o podría ser el producto de una fermentación por un manejo de las muestras (Del Hierro et al., 2020). Nuestro trabajo confirma la presencia del ácido glucónico como un compuesto abundante en en el extracto de AD. El ácido glucónico podría aportar a la capacidad antioxidante de la harina de AD, ya que se ha identificado a este compuesto como el principal ácido orgánico y

el principal responsable de la capacidad antioxidante de la miel (Pauliuc et al., 2020).

7.1.5 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la harina de *Acheta domesticus*

Estudios recientes han sugerido que el consumo de insectos podría disminuir el estrés oxidativo debido a su capacidad antioxidante (D' Antonio et al., 2021). Por lo tanto, en extractos de mezclas de agua y etanol a partir de AD se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante por ABTS y DPPH (Figuras 4, 5 y 6). En todas las determinaciones, el nivel más alto se encontró en la extracción acuosa, destacándose el caso de los compuestos fenólicos totales, donde la extracción realizada con 100 % de etanol no mostró ninguna absorbancia mientras que, el contenido de estos compuestos en los extractos acuosos fue mayor a medida que aumentaba la concentración de agua.

Lo anterior sugiere que los compuestos extraídos con capacidad antioxidante son altamente solubles en agua y estos posiblemente son carbohidratos y ácidos orgánicos y compuestos fenólicos (Pauliuc et al., 2020). Los resultados de la figura 4, se pueden explicar debido a que el reactivo Folin es una sustancia altamente oxidante. Debido a lo anterior, carbohidratos reductores y ácidos orgánicos, así como fenoles pueden generar reaccionar con el reactivo Folin.

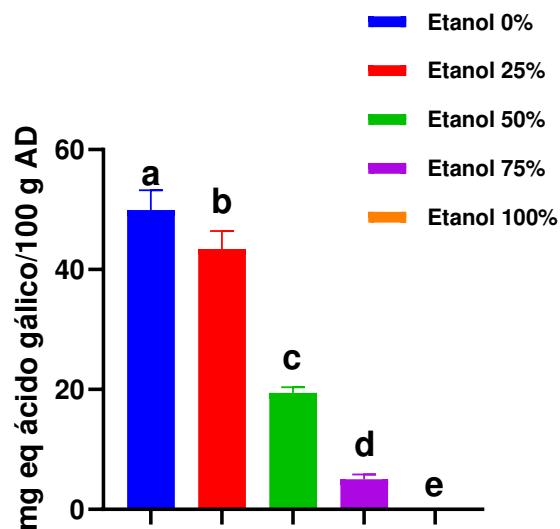


Figura 4. Compuestos fenólicos totales de extractos de *Acheta domesticus*, obtenidos con mezclas de etanol agua en diferentes proporciones. Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar, (n = 3). Letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

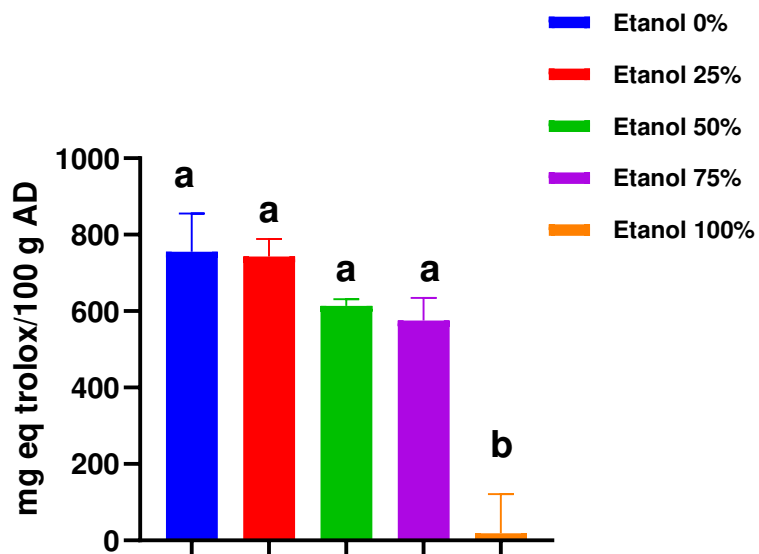


Figura 5. Capacidad antioxidante evaluada con el radical ABTS de extractos de *Acheta domesticus*, obtenidos con diferentes mezclas de etanol agua. Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar, (n = 3). Letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

En cuanto a la capacidad antioxidante medida por el radical ABTS, mostró un comportamiento similar a la determinación de compuestos fenólicos totales (figura 4). Mientras que, la capacidad antioxidante por DPPH fue más alta con agua al 100%, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre todos los extractos realizados con diferentes concentraciones de agua. Adicionalmente, la capacidad antioxidante del extracto en etanol fue mayor en la prueba de DPPH comparada con la del ABTS; esto se puede atribuir a que el radical DPPH tiene una mayor afinidad a moléculas menos polares que el ABTS. Lo anterior indica que parte importante de la capacidad antioxidante medida en los extractos de AD es aportada por compuestos polares (Gómez-Velázquez et al., 2021).

Como se muestra en el Cuadro 2, en la harina de AD se cuantificaron compuestos fenólicos (0.55 g/100 g). Resultados similares han sido descritos por del Hierro y colaboradores (2020), quienes reportaron un rango de concentración de 0.3 - 5.0 g/100 g. Por otro lado, un estudio reciente de Nino y colaboradores (2021) encontró concentraciones de 1.9 - 2.1 g/100 g de compuestos fenólicos totales. Estos autores analizaron los extractos de AD utilizando UPLC-MS/MS encontrando 17 compuestos fenólicos, siendo los ácidos 4-hidroxibenzoico, *p*-cumárico, ferúlico y siríngico, los principales compuestos. Los autores sugieren que los compuestos fenólicos detectados en la AD se encuentran también en las plantas, ya que éstas son su principal fuente de alimentación. Por lo tanto, los compuestos fenólicos son absorbidos de la dieta y encontrarse en AD, sin embargo, se desconoce si estos compuestos estén adentro del sistema circulatorio de los insectos o simplemente en su contenido digestivo.

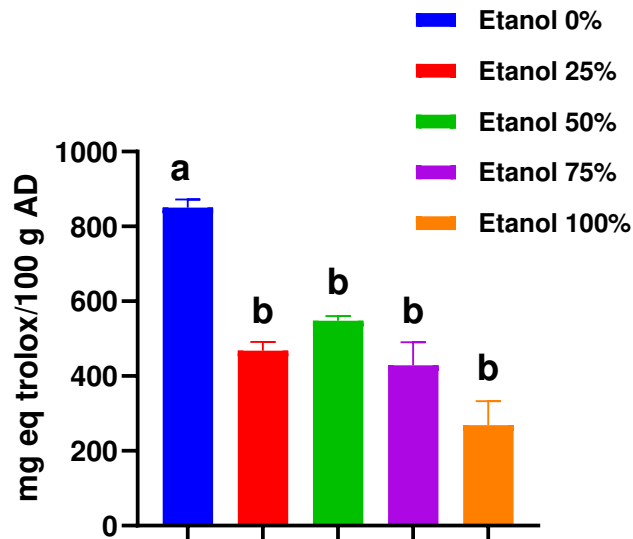


Figura 6. Capacidad antioxidante medida por el radical DPPH de extractos de *Acheta domesticus*, obtenidos con mezclas de etanol agua en diferentes proporciones. Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar, (n = 3). Letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Los ensayos antioxidantes *in vitro* son la primera etapa en la búsqueda de matrices alimentarias con potencial antioxidante (Di mattia et al. 2019). Por lo tanto, en este estudio fue importante determinar el potencial antioxidante de la harina de grillo completa, para esto se empleó el método QUENCHER. Esta técnica se determina en la matriz completa del alimento sin extracción con solventes (Del Pino-García et al., 2015). Asimismo, las técnicas de QUENCHER determinan la capacidad antioxidante de compuestos insolubles en la harina de AD, como algunas proteínas y la quitina.

El IC_{50} medido por Q-ABTS fue de 0.434 mg/mL y para Q-DPPH fue de 0.677 mg/mL, respectivamente. Estas inhibiciones, difieren de las reportadas por Nino y colaboradores (2021), quienes encontraron un IC_{50} de 0.06 mg/mL y 0.346 mg/mL para ABTS y DPPH, respectivamente. Estas diferencias podrían atribuirse al tratamiento postcosecha del grillo. Nino y colaboradores (2021) evaluaron la capacidad antioxidante de grillos liofilizados, proceso por el cual los compuestos antioxidantes de AD pueden conservarse mejor. Mientras tanto, en nuestro trabajo, el grillo fue sometido a un proceso de escaldado y secado para reducir el número

de microorganismos y estos procesos pueden degradar los compuestos antioxidantes.

En este sentido, se ha reportado que la capacidad antioxidante de extractos acuosos de insectos comestibles dependen de la dieta de crianza, ya que los insectos alimentados con una dieta vegetariana ejercen una capacidad antioxidante mayor que los insectos con una dieta carnívora (Di mattia et al., 2019). Por ejemplo, de acuerdo a lo reportado por Di mattia colaboradores (2019), los extractos obtenidos de insectos con una dieta predominantemente vegetariana (grillos, orugas y saltamontes) tuvieron una capacidad antioxidante hasta 14 veces mayor en comparación con insectos con una dieta predominantemente carnívora (arácnidos y escorpiones).

7.1.6 Determinación de punto isoeléctrico de proteínas de AD

Para determinar la solubilidad de las proteínas de AD se realizó una extracción por el método diferencial de pH, donde la harina de AD se sometió a diferentes valores de pH para identificar el valor de mayor solubilidad, así como el

punto isoeléctrico. En la Figura 7 se muestra la cantidad de proteína solubilizada en soluciones amortiguadoras a diferentes pH de la harina de AD.

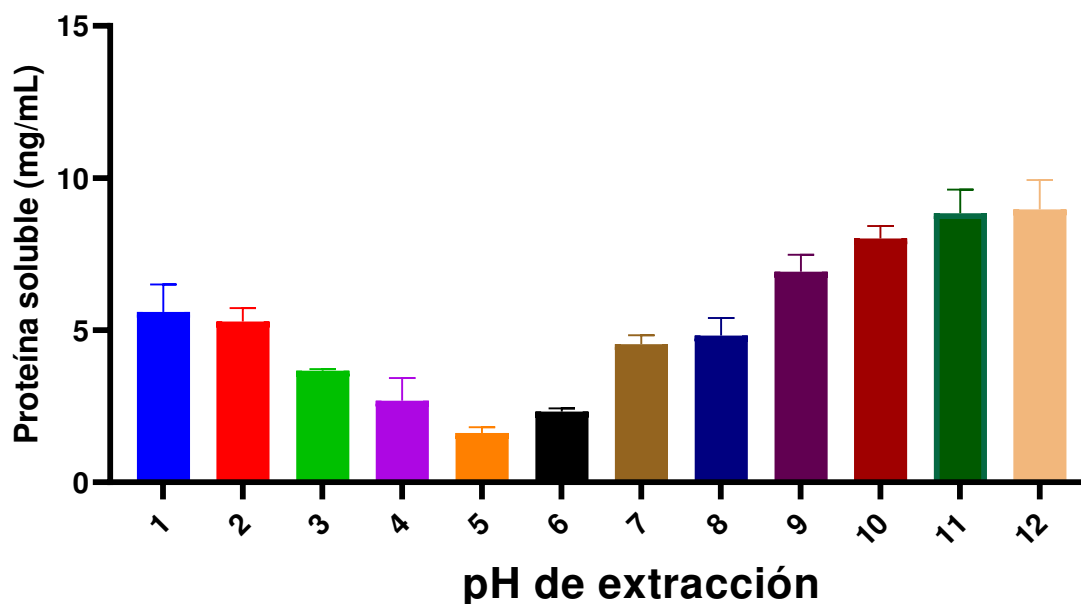


Figura 7. Proteína de harina de *Acheta domesticus* solubilizada a diferentes pH (1-12).

La máxima solubilización de la proteína se presentó a pH 12 y la menor a pH 5. Sin embargo, el porcentaje de solubilización de proteína respecto a la proteína total de la harina de AD (rendimiento de solubilización) fue solamente del 20 % (Figura 8). Es posible que el tratamiento térmico al cual se sometió la harina comercial de AD (escaldado y horneado) generó agregados proteicos al ser desnaturizada la proteína.

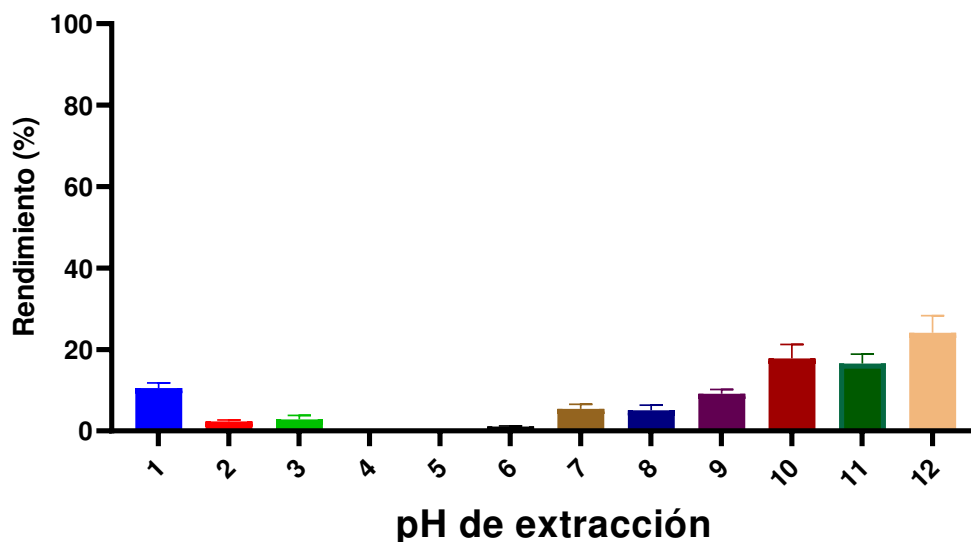


Figura 8. Rendimiento de extracción de proteína a diferentes pH (1 – 12) a partir de harina de *Acheta domestica*.

Para determinar el efecto del proceso de elaboración de harina de grillo sobre la extracción de la proteínas se evaluaron 4 tratamientos: grillo hervido (95 °C, 5 min) y horneado (120 °C, 30 min), solamente horneado (120 °C, 30 min), deshidratado (37 °C, 18 h) y liofilizado.

Los resultados obtenidos respecto a la eficiencia de extracción de proteína con los diferentes tratamientos postcosecha del grillo se muestran en la Figura 9. En los tratamientos de hervido y horneado y solamente horneado las eficiencias de extracción fueron bajas, comparados con los tratamientos que no fueron sometidos a altas temperaturas, siendo el proceso de liofilizado con la mayor extracción, seguido por el grillo deshidratado.

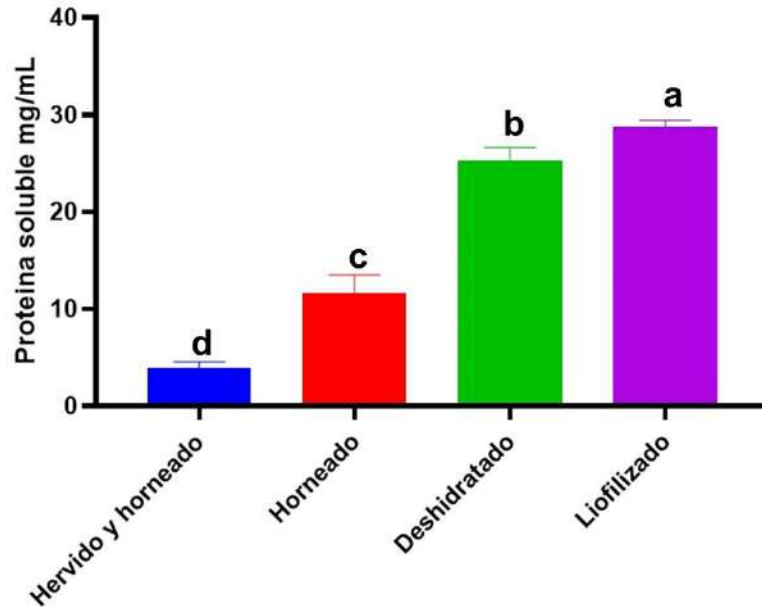


Figura 9. Rendimiento de extracción de proteína de *Acheta domesticus* con diferentes procesos térmicos, a pH 10. Los valores corresponden a medias \pm desviación estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

De acuerdo al resultado anterior, es evidente el efecto que ejerce el tratamiento térmico sobre la solubilidad de la proteína, comportamiento reportado previamente por Montowska y colaboradores (2019). Estos autores realizaron una electroforesis de proteínas extraídas de AD, encontrando que la mayoría de los extractos de las proteínas forman agregados, identificando solo las proteínas más termoestables.

Con los resultados presentados se demuestra que el proceso de elaboración de la harina de grillo en el cual se utilizan altas temperaturas generan agregados proteicos y solamente el 5% de las proteínas se solubilizan. Por lo tanto, en esta muestra no fue posible separar las proteínas de los carbohidratos complejos. En las siguientes etapas del presente proyecto se trabajó con la harina completa de AD.

7.2. Efecto de dietas suplementadas con harina de AD en un modelo de obesidad

7.2.1. Peso corporal y el peso relativo del tejido adiposo blanco

Se evaluó el efecto del consumo de grillo (*Acheta domesticus*) sobre el control de enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad. La suplementación de harina de AD en una DAGF, a pesar de no disminuir su ingesta calórica, produjo un menor peso corporal y acumulación de tejido adiposo. En el Cuadro 6 se presenta el peso corporal inicial de los cuatro grupos experimentales, donde las medias de todos los grupos fueron de 190-200 g; después de 16 semanas de experimentación, el grupo DAGF presentó un mayor peso corporal (30%) respecto al peso corporal del grupo alimentado con una dieta estándar. Los animales en los que se incluyó AD al 4 y 8 % en la dieta mostraron 6.9 y 11.6 %, respectivamente menor peso corporal comparado con los animales alimentados con una DAGF.

En cuanto al consumo calórico no se observaron diferencias estadísticas en los cuatro grupos experimentales. Por lo tanto, la reducción de peso por la inclusión de AD en la DAGF no se puede atribuir a una reducción del apetito y a una menor ingesta de energía (Cuadro 6).

La distribución y el peso del tejido adiposo blanco (TAB) están estrechamente relacionadas con las comorbilidades de la obesidad. El riesgo de desarrollo de resistencia a la insulina y las dislipidemias aumentan cuando incrementa un 65% el tejido adiposo visceral (TAV) (Wajchenberg et al., 2002). Al igual que los humanos, los roedores tienen diferentes depósitos de TAB, como mesentérico, epidídimal y retroperitoneal, por lo que en este estudio se evaluaron de forma específica diferentes depósitos de tejido adiposo blanco (Chusyd et al., 2016).

Cuadro 6. Efecto del consumo de una DAGF la suplementación de *Acheta domesticus* en sobre la ganancia de peso, consumo de alimento, índice de masa corporal y peso relativo de los tejidos adiposos blancos en ratas Wistar.

	Grupos			
	Dieta estándar	DAGF	DAGF + 4 % AD	DAGF + 8 % AD
Peso corporal inicial (g)	192.2 ± 10.1 a	194.0 ± 12.5 a	197.0 ± 13.5 a	198.2 ± 13.2 a
Peso corporal final (g)	542.4 ± 23.7 b	707.2 ± 25.2 a	658.8 ± 23.7 a	625.6 ± 23.7 ab
Ganancia de peso (Δ)	350.1 ± 38.6 c	511.7 ± 60.4 a	461.8 ± 81.8 ab	411.3 ± 50.1 bc
Consumo de alimento (g/día/rata)	28.2 ± 3.0 a	23.8 ± 1.5 b	23.5 ± 1.4 b	25.0 ± 2.6 b
Consumo calórico (KJ/día/rata)	552.3 ± 57.3 a	539.0 ± 33.8 a	528.7 ± 32.1 a	555.4 ± 56.8 a
Tejido adiposo blanco (%)				
Mesentérico	0.7 ± 0.1 c	1.8 ± 0.4 a	1.7 ± 0.2 ab	1.3 ± 0.3 b
Epididimal	1.5 ± 0.2 c	3.4 ± 0.6 a	3.6 ± 0.5 a	2.6 ± 0.6 b
Retroperitoneal	1.2 ± 0.2 b	4.2 ± 0.5 a	3.3 ± 0.6 a	3.4 ± 0.9 a

Los valores corresponden a medias ± desviación estándar (n = 8). Letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

El tejido adiposo mesentérico (TAM) se localiza paralelo al intestino y se menciona como el TAB más parecido entre las ratas y humanos debido a su ubicación y vascularización (Chusyd et al., 2016). En este estudio, aumentó el peso relativo del tejido adiposo mesentérico del grupo DAGF un 59 % con respecto al TAM del grupo DS. La inclusión de AD al 4 % en la DAGF tuvo un 6.5% menos acumulación de TAM. El TAM del grupo DAGF + 8 % AD fue menor en un 27 %, mostrando una diferencia estadística respecto al TAM del grupo DAGF.

La acumulación de TAM está relacionada con el desarrollo de disfunción metabólica. El TAM es el punto inicial de llegada de los quilomicrones desde el intestino, se desplazan a través de la vena cava sin pasar por el hígado, lo que desencadena diversas respuestas inflamatorias en el TAM (Tchkonia et al., 2013). Por lo tanto, la reducción de la acumulación de lípidos en la grasa mesentérica en ratas que recibieron una dieta suplementada con harina de AD sugiere que el efecto antiobesogénico podría disminuir las complicaciones asociadas a la inflamación.

Respecto al peso relativo del tejido adiposo epididimal (TAE), se observó un incremento del 122% en el grupo DAGF comparado con el TAE de los animales alimentados con una dieta estándar. En los animales donde se incluyó AD al 4 % en la dieta, el TAE fue similar al de los animales alimentados con una DAGF. Sin embargo, los animales consumieron la harina de AD al 8 % mostraron un 25 % menos de acumulación de TAE en comparación con el TAE del grupo DAGF. Este tejido adiposo se localiza en la región perigonadal y muestra un fenotipo típico de tejido adiposo blanco, por lo que la reducción del TAE en los animales suplementados con AD es beneficioso (Zhang et al., 2018).

El tejido adiposo retroperitoneal (TAR) se encuentra alrededor de los riñones; en este estudio, El TAR del grupo alimentado con una DAGF muestra un incremento del 225%, en comparación con el TAR del grupo dieta estándar. El consumo de una DAGF suplementada con AD al 4 y al 8 % de AD no generó cambios en la acumulación de este tejido adiposo.

Interesantemente, el grupo suplementado con AD en la DAGF mostró una reducción en la acumulación de TAE pero no mostró efectos en la acumulación de TAR; esto podría deberse a que existen diferencias en la dinámica celular de los preadipocitos (Tchkonia et al., 2013). De acuerdo a lo reportado de por Wang y colaboradores (1989), el tejido adiposo retroperitoneal tiene una mayor capacidad de replicación que el epididimal.

Finalmente, la suma del peso relativo del tejido adiposo visceral diseccionado (TAM + TAE + TAR) en el grupo alimentado con la DAGF fue 164% mas alto respecto al de las ratas alimentadas con una dieta estándar. Los grupos alimentados con una DAGF + 4% AD y DAGF + 8% AD mostraron menor cantidad del tejido adiposo visceral 7.5% y 22%, respectivamente, en comparación con el TAV de los animales alimentados con una DAGF.

La reducción de la acumulación de tejido adiposo visceral con la inclusión de harina de AD en la DAGF sugiere que la harina de AD puede tener un efecto protector en las complicaciones relacionadas con la obesidad de los animales alimentados con la DAGF. La acumulación de TAV está estrechamente relacionada

con el síndrome metabólico. Se ha reportado la reducción del 15% de la ganancia de masa grasa (epididimal + visceral) con la suplementación con quitina-glucano en ratones con una dieta alta en grasa (Neyrinck et al., 2019). Por lo tanto, el efecto observado podría estar asociado a la quitina.

7.2.2. Tamaño de adipocitos y triglicéridos en el tejido adiposo mesentérico.

En la Figura 10B se muestra que el grupo DAGF tiene mayor acumulación de triglicéridos en el tejido adiposo mesentérico en un 49 % en comparación con las ratas alimentadas con una dieta estándar. Mientras que, los animales tratados con una DAGF + 4% AD y DAGF + 8% AD presentaron un menor contenido de TG en el tejido adiposo en un 4 y 19%, respectivamente.

La menor ganancia de peso corporal y la acumulación de tejido adiposo (Cuadro 6), así como la reducción del tamaño de los adipocitos y la acumulación de TG en el tejido adiposo (Figura 10) en las ratas alimentadas con DAGF y suplementada con harina de *Acheta domesticus*, principalmente al 8% puede estar relacionada con una menor absorción intestinal de lípidos de la dieta.

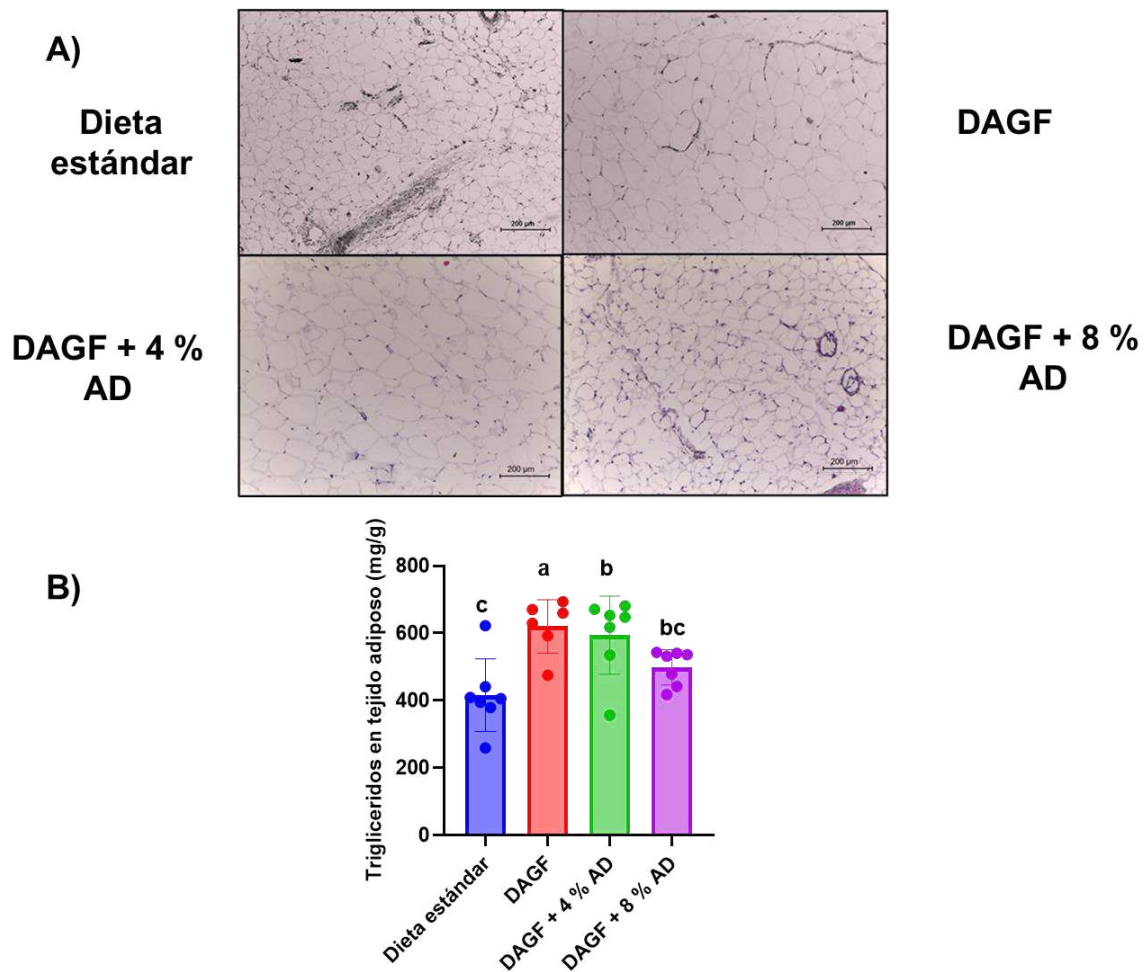


Figura 10. Efecto del consumo de una DAGF suplementada con la harina de *Acheta domesticus* sobre la morfología de los adipocitos (A) y el contenido de triglicéridos en el tejido adiposo mesentérico (B). Los valores corresponden a medias \pm desviación estándar ($n = 8$). Letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

En la Figura 11 se muestra que los animales alimentados con DAGF (20% de grasa en la dieta) tuvieron 47 % más lípidos en las heces que los animales alimentados con una dieta estándar (12 % de grasa en la dieta). Cuando los animales consumieron 4 % de harina de AD en la DAGF se presentó un incremento del 27 % de lípidos totales en heces comparado con el grupo alimentado con una DAGF; al incluir AD al 8 %, el contenido de lípidos en las heces fue mayor en un

98% al del grupo DAGF. El aumento significativo de la grasa fecal excretada cuando se suplementó con AD indica que las grasas de la dieta fueron menor absorbidas.

Existen varias formas de explicar la excreción de lípidos; la primera es que la harina de grillo tiene capacidad de retener entre 0.6 - 3 gramos de aceite por gramo de harina de grillo (Zielińska et al., 2018). Otra explicación para el incremento de excreción de lípidos fecales en los animales alimentados con dietas con 8 % de harina de AD está relacionada con la inhibición de la enzima digestiva lipasa pancreática (LP). LP es la lipasa secretada por el páncreas y tiene un papel central en el metabolismo de las grasas; esta enzima hidroliza los triglicéridos del alimento en monoglicéridos y ácidos grasos libres, los cuales se absorben en el intestino delgado, llegando al sistema circulatorio y posteriormente se almacenan en el tejido adiposo. Por lo tanto, la inhibición de LP podría reducir la absorción de TG y la acumulación de tejido adiposo, mejorando el control de la obesidad (Mendoza-Sánchez et al., 2019; Liu et al., 2020).

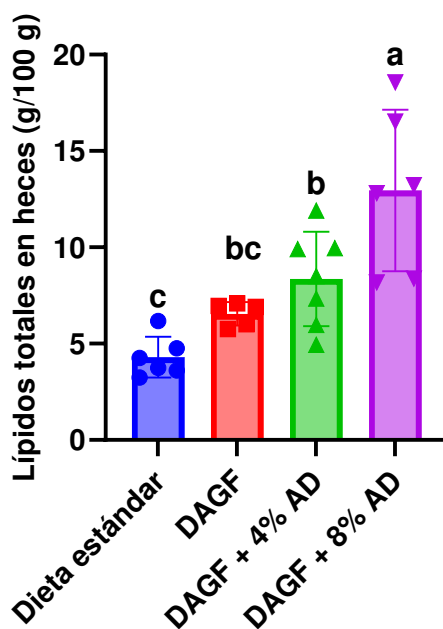


Figura 11. Efecto de la suplementación de la harina de *Acheta domesticus* en una DAGF sobre los lípidos totales en heces. Los valores corresponden a medias \pm desviación estándar (n = 8). Letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Un componente del grillo con un efecto inhibitor sobre LP es la quitina. La quitina es un polisacárido de la N-acetilglucosamina y está ampliamente distribuida en invertebrados marinos, hongos e insectos (Ibitoye et al., 2018). De acuerdo a Han y colaboradores (1999), el complejo quitina-quitosano administrado a ratones con una dieta alta en grasas mejoró la excreción de grasas y redujo el peso corporal. En este estudio, la cantidad de quitina en la harina de AD es del 6 %, por lo que parte del efecto de incremento de excreción de grasas en los animales alimentados con una DAGF suplementada con AD, podría atribuirse al contenido de quitina de AD.

El incremento de la adiposidad y del peso corporal frecuentemente producen un aumento de la concentración de triglicéridos y colesterol en suero. Por lo tanto, en este estudio se evaluó el efecto de la suplementación con AD sobre el perfil lipídico en ratas alimentadas con DAGF.

7.2.3. Perfil lipídico

El efecto de AD sobre el perfil de lípidos se muestra en la Figura 12. Las ratas alimentadas con DAGF presentaron un incremento del 125 % en los triglicéridos séricos (Figura 12 A). En cuanto al colesterol total en suero, no se observaron diferencias en el grupo alimentado con una DAGF respecto al grupo alimentado con la dieta estándar (Figura 12 B). Sin embargo, el HDL-c en suero del grupo DAGF disminuyó en un 28 % respecto al de los animales alimentados con una dieta estándar (Figura 12 C).

Los animales que consumieron de la harina de AD mostraron una reducción en la concentración de triglicéridos en suero en comparación con el grupo DAGF (31 – 37 %). En el parámetro de colesterol total no se observaron diferencias entre los valores de los animales suplementados con AD y el grupo control obeso. Respecto a la concentración en suero de HDL-c, el grupo DAGF + 4 % AD presentó una concentración similar al grupo con DAGF, los animales alimentados con una DAGF + 8 % AD mostraron un aumento del 25 % respecto al grupo DAGF, con valores similares a los animales alimentados con una dieta estándar.

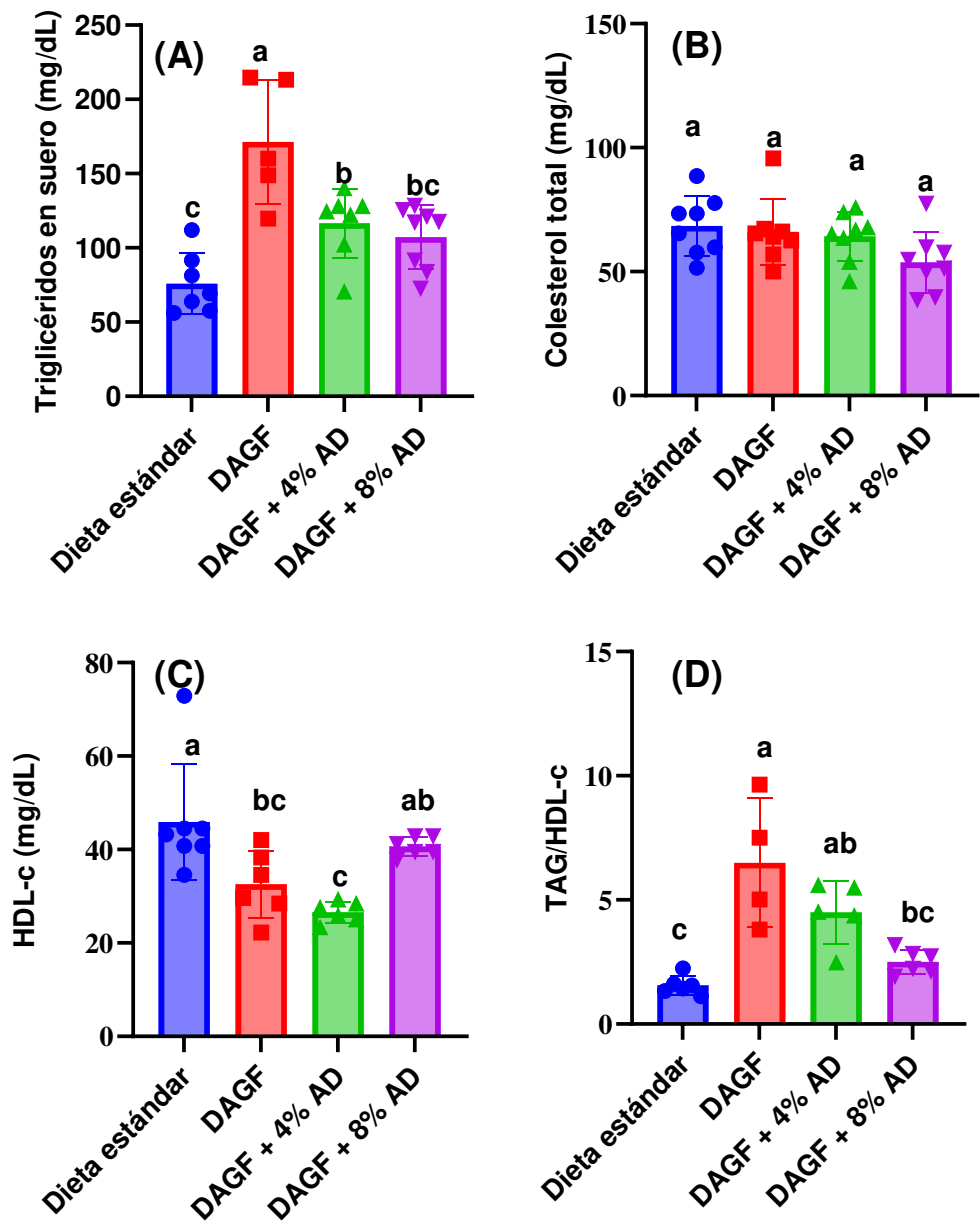


Figura 12. Efecto de la suplementación de harina de *Acheta domesticus* en una DAGF sobre triglicéridos en suero (A); colesterol total en suero (B); HDL-c en suero (C) y TAG/HDL-c (D). Los valores corresponden a medias \pm desviación estándar (n = 8). Letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Estudios anteriores han informado de que los componentes presentes en el grillo pueden mejorar el metabolismo de los lípidos. Según Tao y colaboradores

(2019), los oligosacáridos de quitosano (COS, por sus siglas en inglés) a una dosis de 400 mg/kg de peso corporal administrados a ratones alimentados con una dieta alta en grasas reduce el colesterol total, los triglicéridos séricos y la LDL y aumenta los niveles de HDL en suero. Este efecto se relacionó con la disminución de la expresión de los genes hepáticos implicados en el metabolismo de los lípidos. Los autores demostraron que el tratamiento con COS disminuyó la expresión del factor de transcripción SREBP-1c, el cual participa en la expresión de enzimas que participan de la síntesis de lípidos. Además, los autores reportaron que el tratamiento con COS aumenta la expresión hepática de los transcritos de la β -oxidación, PPAR α y CPT-1. Por lo tanto, el efecto antilipidémico de COS podría estar relacionado con una inducción de la β -oxidación y una disminución de la síntesis de ácidos grasos. Debido a lo anterior, futuros estudios deberán determinar el efecto del consumo de AD sobre los genes del metabolismo lipídico.

El efecto antilipidémico de la suplementación con grillos en la dieta ha sido reportado por Bergmans y colaboradores (2020). El consumo de una dieta suplementada con grillo mostró un 42 % menos triglicéridos. Sin embargo, el objetivo en estos estudios fue evaluar la calidad de las proteínas y la capacidad de una dieta a base de grillos para recuperar la desnutrición proteica en etapas tempranas.

Los altos niveles de triglicéridos y los bajos niveles de HDL-c en suero están estrechamente relacionados con complicaciones asociadas a la obesidad como la resistencia a la insulina. Se ha demostrado que la relación de TG/HDL-c correlaciona positivamente con marcadores de resistencia a la insulina como *Homeostasis Model Assessment* (HOMA-IR) e insulina sérica después de la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) (Borrayo et al., 2018; Pantoja-Torres et al., 2019). En la Figura 12D se muestra que el grupo DAGF tiene un valor DE HOMA-IR 3.16 veces más alto comparado con el HOMA-IR del grupo alimentado con la dieta estándar, los grupos DAGF + 4% AD y el DAGF + 8% AD, mostraron un comportamiento dosis-dependiente con una reducción del 30 % y 60 %, respectivamente, en este parámetro. Lo anterior puede sugerir que el consumo de

AD puede ejercer un efecto benéfico en la resistencia a la insulina. Para corroborar este último punto se evaluó el efecto de la suplementación con AD en la DAGF sobre el metabolismo de la glucosa.

7.2.4 Intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina.

La insulina es un regulador primario del homeostasis de la glucosa y tejidos como el músculo y el tejido adiposo con resistencia a esta hormona se caracterizan por la incapacidad de incorporar la glucosa sanguínea a sus celular, lo que genera una tolerancia a la glucosa alterada, teniendo un papel importante en el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Singh & Saxena, 2010; Pantoja-Torres et al., 2019). Debido a lo anterior se evaluó la resistencia a la insulina de los animales suplementados con AD en la DAGF.

La prueba de tolerancia oral a la glucosa es una prueba ampliamente utilizada en la práctica clínica para detectar la eficiencia del cuerpo para la utilización de la glucosa después de una carga de este carbohidrato, simulando la condición posprandial (Singh & Saxena, 2010). En esta investigación se evaluó el OGTT en el modelo *in vivo* en la semana 16 del estudio, aproximadamente 5 días antes del sacrificio. En la Figura 13A se muestra que el grupo alimentado con una dieta estándar presentó los niveles más bajos de glucosa en ayunas y también después de la carga de glucosa (2 g/kg), la cual aumentó 60 % a los 60 minutos y con una disminución 13 % a los 120 minutos. El grupo alimentado con una DAGF tuvo el nivel de glucosa inicial más alto en condiciones de ayuno, con un nivel máximo al minuto 60 después de la carga de glucosa, presentando una ligera disminución del 10 % a los 120 minutos. Los animales alimentados con una DAGF y suplementada con harina de grillo al 4 y 8 % tuvieron menores niveles de glucosa en ayunas respecto al grupo alimentado con una DAGF. En ambos grupos se observó un aumento en los niveles de glucosa en sangre en el minuto 60 después de la carga de glucosa del 47 %, manteniéndose constante hasta lograr una ligera disminución del 5 % a los 120 minutos, con concentraciones de glucosa en sangre 20 % menor comparado con el del grupo alimentado con la DAGF.

El área bajo la curva (AUC) es una métrica obtenida de OGTT para el diagnóstico de hiperglucemia, es usada como un predictor para identificar a las personas con riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (Alyass et al., 2014; Cheng et al., 2015; Kuo et al., 2018).

Como se esperaba, el AUC del grupo alimentado con una DAGF mostró un aumento del 39% en el AUC en comparación con los animales alimentados con la dieta estándar (Figura 13B). Cuando los animales se alimentaron con la harina de grillo al 4 % y al 8 %, el AUC fue menor en un 17% en comparación con la AUC del grupo alimentado con una DAGF, demostrando que la suplementación con harina de grillo en una DAGF durante 16 semanas disminuye la intolerancia a la glucosa generada por una DAGF.

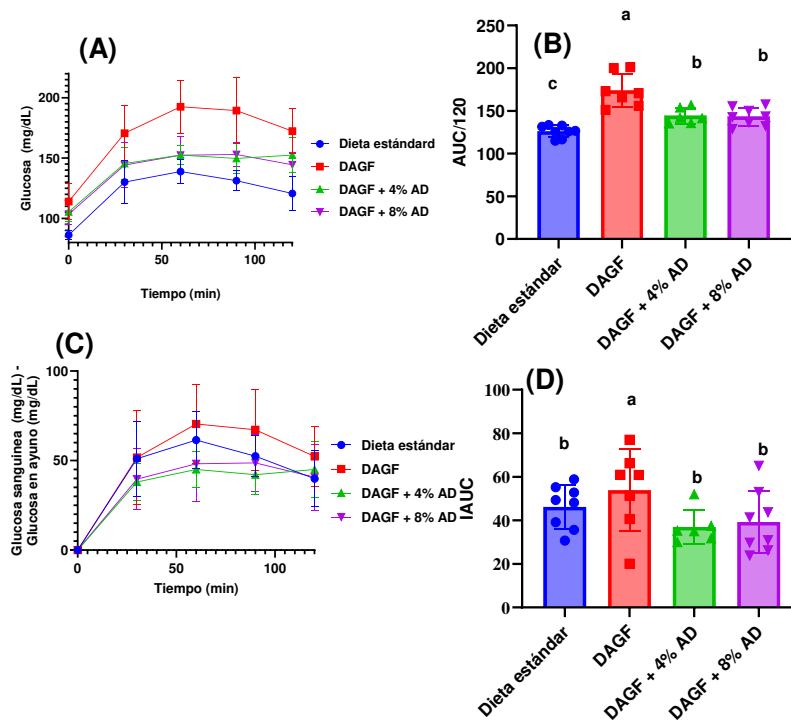


Figura 13. Efecto del consumo de la DAGF suplementada con harina de grillo al 4 y 8 % durante 16 semanas sobre la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) (A) y área bajo la curva correspondiente a la OGTT (B). Valores de glucosa en sangre durante la OGTT y restando el nivel basal de glucosa (C) y área incremental bajo la curva (D). Los valores corresponden a medias \pm desviación estándar ($n = 8$). Letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Debido a las variaciones en los niveles de glucosa en ayunas, se desarrolló el área incremental bajo la curva (iAUC), restando la línea base de glucosa en ayunas a los valores de glucosa sanguíneos después de la carga de glucosa, lo anterior para eliminar las interferencias en la interpretación generada por los niveles de glucosa sanguínea en ayunas (Cheng et al., 2015; Kuo et al., 2018) En este estudio se evaluó la suplementación de la harina de AD en la DAGF sobre la iAUC (Figura 13 C y D). El grupo DAGF mostró un incremento del 47 % de iAUC en comparación con el grupo DS; mientras que, los grupos DAGF + 4 % AD y DAGF + 8 % AD presentaron un comportamiento similar en iAUC que al del grupo DS, lo que sugiere que la harina de AD tuvo un efecto en la disminución de la tolerancia a la glucosa alterada ocasionada por la DAGF.

El último resultado debe tomarse con precaución porque varios autores sugieren que el nivel de glucosa basal no siempre se puede eliminar en las pruebas de tolerancia a la glucosa, debido a varios factores que pueden afectar los niveles de glucosa basal. En las ratas que reciben tratamiento pueden cambiar la glucosa en ayunas por un efecto de disminución en la resistencia a la insulina en hígado, músculo y tejido adiposo y este efecto puede no estar contemplado en iAUC (Cheng et al., 2015; Kuo et al., 2018).

Diversos estudios han demostrado que la forma de la curva de glucosa obtenida de la OGTT puede usarse como un predictor del desarrollo de diabetes tipo 2 (Jagannathan et al., 2020). Por lo tanto, se han utilizado varios modelos estadísticos para analizar la forma de la curva de glucosa y se han descrito cuatro clases de patrones de esta curva. La clase 1-2 se asocia con un bajo riesgo de diabetes tipo 2 y la clase 3-4 se asocia con un alto riesgo de desarrollar diabetes 2 (Hulman et al., 2018; Jagannathan et al., 2020).

Debido a lo anterior, en este estudio se empleó la herramienta en línea gratuita que ayuda a simplificar el análisis de la curva de forma de OGTT (<https://steno.shinyapps.io/grc2h/>). Las ratas alimentadas con dieta estándar tuvieron un 98% de probabilidad de clasificarse como clase 2, es decir un nivel bajo de intolerancia a la glucosa; en tanto, el grupo DAGF tuvo un 100 % de posibilidad de clasificar como clase 4. Los grupos DAGF + 4 % AD y DAGF + 8 % AD también se clasificaron como clase 4. Sin embargo, las probabilidades de ser clasificado en esta clase disminuyeron a medida que se incluyó la harina de AD en la dieta al 4 y 8%, con un 77 y 65 %, respectivamente.

La prueba OGTT genera información útil sobre la tolerancia a la glucosa, pero no es precisa para el diagnóstico de la resistencia a la insulina; mientras que, el valor de HOMA-IR es la alternativa más utilizada para diagnosticar la resistencia a insulina (Bonora et al., 2000). El valor de HOMA-IR es un modelo que se utiliza para predecir las relaciones de la dinámica de la glucosa y la insulina. El nivel de insulina en suero depende de la actividad de las células β pancreáticas. La glucosa depende de la producción de glucosa en el hígado y de la señalización de la insulina. Por

esta razón, en este estudio se determinó la glucosa y la insulina en ayunas y se calculó el índice HOMA.

En la Figura 14 se muestra que el grupo DAGF presentó niveles mayores de los niveles de insulina y glucosa en ayunas (2.42 y 0.7 veces de cambio, respectivamente) en comparación con los valores de los animales alimentados con una dieta estándar. así mismo, se observó un incremento del 4.5 veces en el índice HOMA. En el grupo alimentado con DAGF con harina de grillo al 4 % no se observó ningún efecto en el valor de insulina, la glucosa y el índice HOMA-IR. Sin embargo, cuando el tratamiento de harina de grillo aumentó al 8 %, durante 16 semanas redujo significativamente la insulina y la glucosa en ayunas (52 y 19 %, respectivamente), en comparación con los valores del grupo DAGF y redujo el índice homa en un 61% con valores similares al grupo DS, lo que sugiere que el consumo de la suplementación con harina de AD al 8 % en la DAGF mejora significativamente la resistencia a la insulina.

La glucosa en ayunas incrementada y la respuesta mejorada en la tolerancia a la glucosa presentes en los grupos DAGF + 4% AD y DAGF + 8% AD se caracterizan por resistencia a la insulina en el hígado y disfunción de las células beta-pancreáticas. Mientras tanto, la combinación de las dos condiciones, la glucosa en ayunas incrementada y la tolerancia a la glucosa alterada, una condición observada en el grupo DAGF, exhibe disfunción progresiva de las células-beta pancreáticas y resistencia a la insulina en tejido adiposo, músculo e hígado (Weir & Bonner-Weir, 2004; Bock et al., 2007; Færch et al., 2015; Kim et al., 2015; Jagannathan et al., 2020).

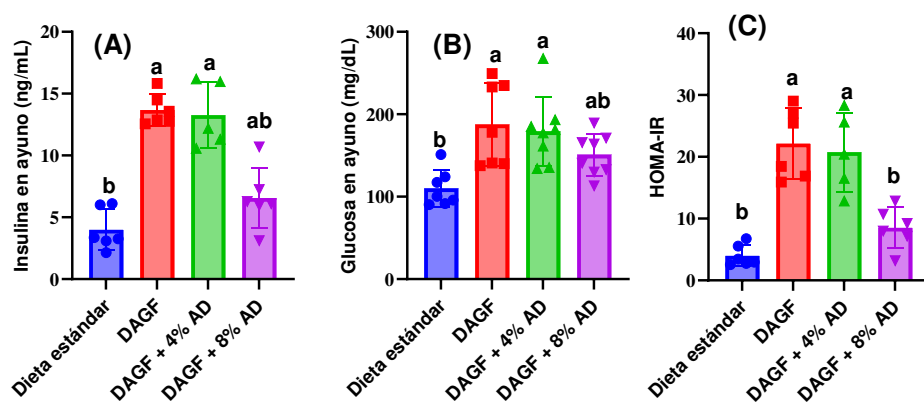


Figura 14. Efecto de la suplementación de harina de *Acheta domesticus* sobre parámetros de resistencia a la insulina. Insulina en ayunas (A). Glucosa en ayunas (B). Índice HOMA-IR (C). Los valores corresponden a medias \pm desviación estándar ($n = 8$). Letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Se ha reportado que algunos compuestos presentes en el grillo pueden impactar positivamente en la resistencia a la insulina y la tolerancia a la glucosa. Zheng y colaboradores (2018) evaluaron el tratamiento con un derivado de la quitina, los oligosacáridos de quitina (COS) a una concentración de 200 mg/kg/día, en ratones alimentados con una dieta alta en grasas durante 20 semanas y se observó una disminución de la glucosa e insulina en ayunas en un 31 y un 100 %, respectivamente, en comparación con los valores del grupo HFD. Los autores reportaron que los ratones tratados con COS incrementaban la abundancia relativa de bacterias benéficas en su microbiota intestinal como *Lactobaccillus* y *Bifidobacterium* y el incremento de las proteínas de unión estrecha del intestino grueso, lo que generó una menor concentración de lipopolisacáridos en el suero y una disminución en la expresión de citosinas inflamatorias en tejido adiposo abdominal.

En nuestro trabajo, las ratas alimentadas con DAGF suplementada con 4 y 8 % de harina de grillo consumieron aproximadamente una concentración de quitina de 144 y 288 mg/kg/día, respectivamente. La mejora de la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa en los grupos alimentados con una dieta suplementada con harina de grillo podría estar relacionada con la modulación de la microbiota

intestinal y la inflamación. Sin embargo, se necesitan más estudios para discernir el mecanismo que ejerce el consumo de la harina de AD sobre la resistencia a la insulina y los componentes bioactivos responsables de este efecto.

7.2.5 Hígado graso no alcohólico

La esteatosis hepática se caracteriza por un incremento del 5 % de la acumulación de grasa en el hígado. La esteatosis hepática puede progresar a esteatohepatitis, fibrosis y, en la etapa terminal, a cirrosis y hepatocarcinoma (Anstee et al., 2019).

Estudios recientes han demostrado que el consumo de los insectos comestibles y sus extractos pueden mejorar la esteatosis hepática en ratas. Según Ham y colaboradores (2021), un extracto obtenido de las larvas comestibles del insecto *Tenebrio molitor*, como sustituto de la proteína de soya en dietas altas en grasas, reduce el aumento del peso corporal, la masa grasa corporal, la intolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina y disminuye la esteatosis hepática. Además, reduce la expresión de las proteínas hepáticas involucradas en la síntesis de lípidos como *CD36* y *PPARY*.

Respecto al grillo comestible *Gryllus bimaculatus*, Hwang y colaboradores (2019) reportaron que el consumo de los extractos de GB durante dos semanas antes de la exposición a etanol 3 veces con intervalos de 12 horas a una dosis de 6 g/kg, atenúan la esteatosis hepática inducida por alcohol, reduciendo el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria. Sin embargo, a la fecha no existen reportes sobre el efecto protector del consumo de AD contra el desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica en una DAGF. Por lo tanto, se exploró el efecto de la suplementación de harina de AD en los cambios morfológicos de los hepatocitos, la acumulación de triglicéridos en el hígado y otros parámetros bioquímicos.

La Figura 15A muestra que el consumo de la DAGF durante 16 semanas incrementó los lípidos almacenados en el tejido hepático, comparado con los lípidos hepáticos del grupo SD, siendo un indicativo del desarrollo de esteatosis hepática. El grupo tratado con AD al 4 % y principalmente al 8 % mostraron una menor acumulación de gotas lipídicas en tejido hepático, siendo indicativo de un efecto

protector por la inclusión de harina de AD en una DAGF contra el desarrollo de hígado graso. La Figura 15B muestra que el grupo DAGF tiene un aumento del 170 % de acumulación de triglicéridos en el hígado, en comparación con el grupo DS. Sin embargo, los niveles de triglicéridos hepáticos de los animales que consumieron una DAGF que se complementó con harina de AD al 4 y el 8 % disminuyeron el 12 y el 31 %, respectivamente, de triglicéridos en hígado. La quitina, un compuesto presente en el exoesqueleto en el grillo AD y sus derivados, como los oligosacáridos de quitosano, pueden disminuir la acumulación de lípidos hepáticos, esto se relacionó a la disminución de la expresión de genes lipogénicos y al aumento de la expresión de genes grasos relacionados con la β -oxidación. Este efecto de supresión de la actividad de la vía de señalización de la proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) (Yu et al., 2014; Tao et al., 2019).

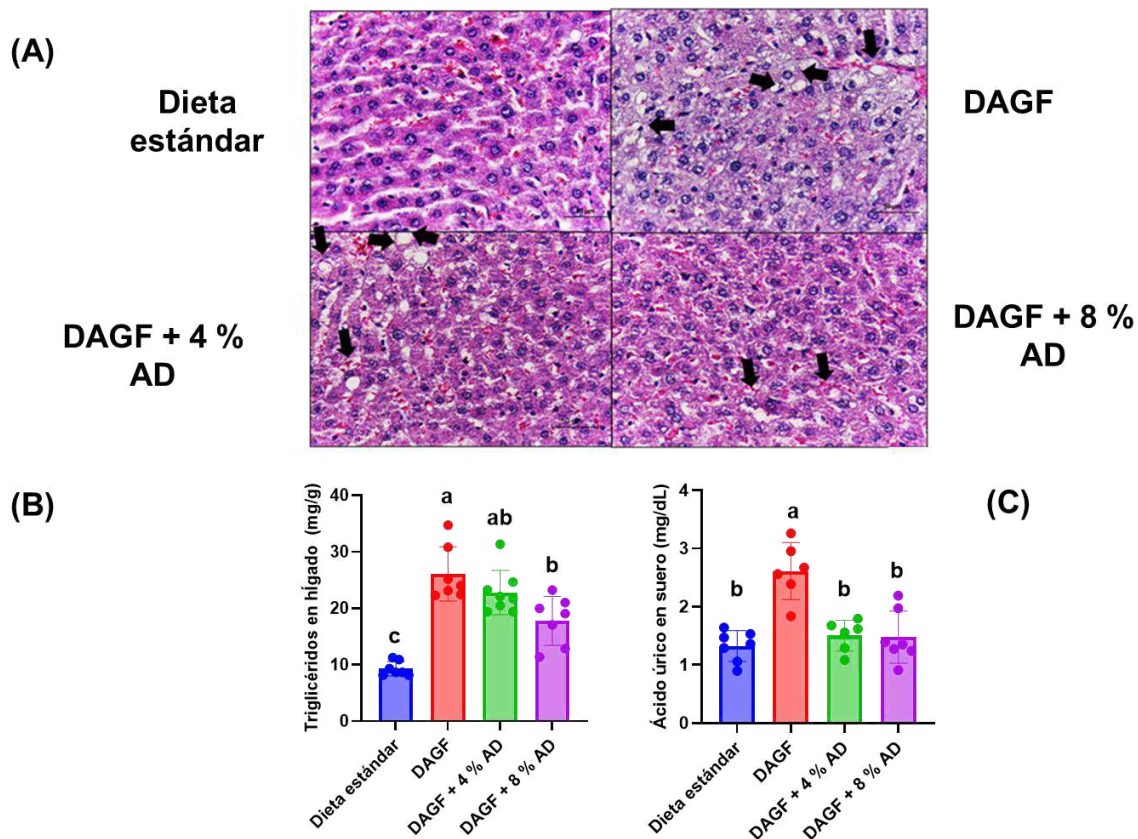


Figura 15. Efecto de la inclusión de (*Acheta domesticus*) en una DAGF sobre la acumulación de gotas lipídicas en tejido hepático (A), acumulación de triglicéridos en hígado (B) y ácido úrico en suero (C). Los valores corresponden a medias \pm desviación estándar (n = 8). Letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

El ácido úrico (AU) es el producto final del metabolismo de las purinas y de la fructosa. El aumento del AU en plasma es un marcador de morbilidad y mortalidad de las enfermedades cardiovasculares y el desarrollo de diabetes 2. El consumo de fructosa en dietas hipercalóricas puede contribuir a la hiperuricemia al estimular el catabolismo de los nucleótidos de adenina. Cuando se consumen grandes cantidades de fructosa se acumula fructosa 1-fosfato en el hígado y se reduce el fosfato intracelular; sin embargo, esta reducción activa la degradación de AMP mediada por AMP desaminasa incrementando la degradación de purina y la producción de AU (Zhang et al., 2020).

En el modelo *in vivo* de obesidad, los niveles plasmáticos de AU en ratas alimentadas con una DAGF incrementaron un 97%, en comparación con el grupo alimentado con una dieta estándar (Figura 15). Sin embargo, cuando las ratas se alimentaron con una DAGF y adicionada con grillo al 4 y 8%, los niveles de AU disminuyeron en un 47 %, mostrando valores similares al grupo alimentado con una dieta estándar.

7.3. Compuestos fenólicos y niveles de MDA en suero

Diferentes estudios han reportado que los extractos de insectos comestibles muestran niveles de capacidad antioxidante *in vitro*. El consumo de alimentos ricos en antioxidantes tiene un papel esencial en la modulación del estrés oxidativo, que es un factor crítico para el desarrollo de la resistencia a la insulina (Hurre & Hsu, 2017). Por lo tanto, para abordar el potencial antioxidante de la harina de AD se cuantificaron los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH en el suero de ratas alimentadas con DAGF y suplementada con AD. En cuanto a la capacidad reductora medida por el reactivo Folin, los grupos alimentados con una DAGF y dieta estándar tuvieron valores similares, pudiendo ser un reflejo de la dieta base que consumieron (Figura 16). Por el contrario, la suplementación con 8 % de AD en las ratas alimentadas con DAGF aumentó la capacidad reductora en el suero en un 37 % (Figura 16 A).

Diferentes compuestos presentes en el suero, como las proteínas, pueden interferir y sobreestimar la cuantificación de los compuestos fenólicos totales en el suero. Sin embargo, las muestras de suero fueron desproteinizadas antes de medir los compuestos fenólicos totales. Por lo tanto, las proteínas podrían tener poca interferencia en la cuantificación de los compuestos fenólicos en el suero de las ratas alimentadas con DAGF suplementado con un 8 % de AD.

La peroxidación lipídica desempeña un papel importante en la patología inducida por la obesidad. Por lo tanto, se midió el MDA en suero, determinación que es considerada un biomarcador del estrés oxidativo, siendo un parámetro derivado de la peroxidación lipídica sistémica (Spirlandeli et al., 2013). Para determinar si la suplementación con AD puede disminuir la peroxidación lipídica. Como se muestra

en la Figura 16, la concentración de MDA en suero en el grupo DAGF fue un 50 % en comparación con los valores de MDA del grupo alimentado con una DS. Los tratamientos con AD al 4 y al 8 % mostraron niveles menores en la concentración de MDA en suero hasta en un 43 % en comparación con los valores de MDA del grupo DAGF.

Por otro lado, la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en suero en el grupo fue similar en todos los grupos, por lo tanto, no se observó efectos significativos en función del grupo experimental en esta enzima, por los niveles menores de peroxidación lipídica encontrados en los tratamientos con AD al 4 y 8 %, no pueden atribuirse al incremento del sistema antioxidante inducido por SOD.

La medición *in vivo* de los ensayos ABTS y DPPH, normalmente realizada en suero, está influenciada por factores externos como los hábitos dietéticos y los tratamientos. Las determinaciones de capacidad antioxidante *in vivo* son influenciadas por varios parámetros, como los hábitos alimenticios y factores ambientales, sin embargo, la capacidad antioxidante en plasma no puede considerarse como un único biomarcador del estado antioxidante de un individuo. Por lo tanto, la capacidad antioxidante en suero puede combinarse con otros marcadores metabólicos, de inflamación, así como la composición de la microbiota para identificar las respuestas de una población a un alimento (Pellegrini et al., 2019). Sin embargo, la suplementación de harina de AD en una DAGF no mejoró la capacidad antioxidante sérica medida por los ensayos ABTS y DPPH.

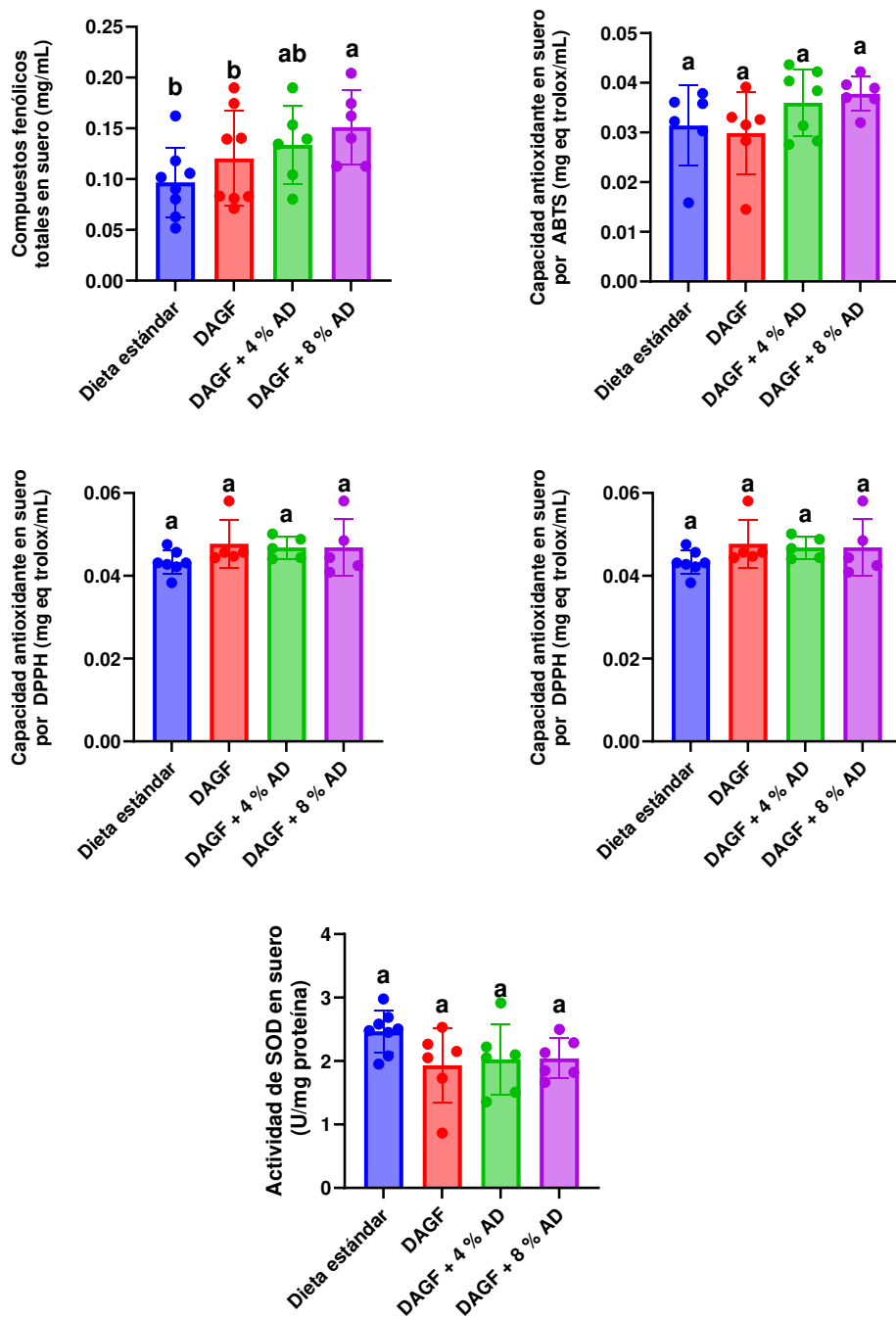


Figura 16. Efecto de la suplementación de la harina de *Acheta domesticus* sobre compuestos fenólicos totales en suero (A) Capacidad antioxidante en suero medida por ABTS y DPPH (B y C). MDA en suero (D). Actividad de la Súper Óxido Dismutasa (E). Los valores corresponden a medias \pm desviación estándar ($n = 8$). Letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). CFT: Compuestos fenólicos totales.

Por lo tanto, deben realizarse más y mejores marcadores para investigar el estatus antioxidante de los animales que se trataron con AD en una DAGF en un modelo preventivo.

Para complementar el entendimiento del efecto fisiológico del consumo de AD en una DAGF se exploró los cambios en la microbiota fecal de las ratas alimentadas con una DAGF.

7.4 Análisis de la microbiota fecal de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa y suplementada con *Acheta domesticus*

7.4.1. Alfa y beta diversidad de la microbiota fecal

Para determinar el efecto de *Acheta domesticus* en el control de la obesidad y sus alteraciones metabólicas y su asociación con la microbiota se analizó la composición de las comunidades bacterianas de las heces de los animales de experimentación. Se utilizó la secuenciación del gen ribosomal bacteriano 16 s y se realizó posteriormente un análisis taxonómico.

En la Figura 17A se presentan las curvas de rarefacción que muestran el número de secuencias obtenidas por grupo en relación con el número de especies observadas. Las curvas de rarefacción muestran un comportamiento estacionario, lo que indica que la mayor parte de la diversidad microbiana de cada grupo alcanzó una profundidad de secuenciación suficiente. El número de especies observadas osciló entre 300 y 500, un número similar reportado por Zhang y colaboradores (2015) en su estudio de la microbiota fecal de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa (60 % de la energía de la dieta correspondía a grasas. En nuestro estudio, en los grupos alimentados con la dieta rica en grasas y fructosa suplementada con 4 y 8 % de AD se cuantificaron aproximadamente 100 especies más en comparación con los grupos de control sanos y obesos (Figura 17B). Este hallazgo se refleja en el índice de alfa diversidad (Figura 17C-D). La alfa diversidad mide la diversidad de especies dentro de una muestra biológica y puede evaluarse mediante los índices de Shannon, Simpson y Fisher.

En las Figuras 17C-D se muestra el índice de alfa diversidad de los diferentes grupos experimentales. El grupo de ratas alimentadas con una DAGF disminuyó los valores de este parámetro en comparación con los animales alimentados con una dieta estándar. Por otro lado, los animales alimentados con la DAGF suplementada con 4 y 8% de grillos mostraron un nivel mayor de alfa diversidad en comparación con los animales que sólo recibieron DAGF. La disminución de la diversidad de la microbiota intestinal se asocia a disbiosis, que conduce a alteraciones metabólicas (Zsálig et al., 2023). En la obesidad, el índice de alfa diversidad de la microbiota fecal suele ser menor lo que indica una menor riqueza de especies microbianas en el intestino, esto está relacionado a que los individuos con altos índices de masa corporal tienden a consumir niveles menores de carbohidratos complejos y fibra dietaria, por lo tanto (Stanislowski et al., 2019)

La reducción de la alfa diversidad, cuantificada por el índice de Shannon en el grupo obeso (Figura 1D), coincide con los resultados de un meta análisis realizado por Pinart y colaboradores (2021). Este meta análisis reportó que 22 estudios encontraron reducciones estadísticamente significativas en el índice de Shannon para individuos obesos en comparación con los no obesos. Por el contrario, sólo 22 estudios mostraron resultados opuestos, mientras que 7 estudios no identificaron diferencias estadísticamente significativas.

El aumento de la alfa diversidad por el consumo de AD en una DAGF puede atribuirse al contenido de fibra presente en la harina de grillo. Una dieta rica en fibra puede aumentar la diversidad de la microbiota intestinal al proporcionar sustratos para el crecimiento de una mayor variedad de microorganismos beneficiosos en el intestino, favoreciendo la producción de metabolitos microbianos beneficiosos como los ácidos grasos de cadena corta.

Según el estudio reportado por Kopf y colaboradores (2018), una dieta rica en granos enteros, frutas y verduras durante 6 semanas conduce a una reducción en los marcadores inflamatorios como IL-6 y TNF- α . Además, esta intervención dietética incrementa la alfa diversidad y disminuye la proporción de *Clostridiales* del filo *Firmicutes*.

Con respecto a la quitina y sus derivados, se ha reportado que la suplementación con quitosano al 5 %, un derivado de la quitina obtenido mediante desacetilación, reduce los marcadores de inflamación sistémica inducida por la obesidad en un modelo de obesidad de ratón durante 1 mes. Además, este tratamiento induce la composición de la microbiota, incrementando la abundancia de bacterias benéficas como *Coprobacillus cateniformis* lo que sugiere un efecto prebiótico (Tang et al., 2020).

En un estudio reciente publicado por Kim y colaboradores (2023) se reportó que los mamíferos codifican un circuito endógeno que permite el catabolismo de la quitina mediante la producción de la enzima quitinasa ácida de mamíferos (AMCasa). Esta vía se caracteriza por la distensión gástrica y la producción de citoquina 2, lo que provoca la remodelación del tracto gastrointestinal y la inducción de la producción de AMCasa, mejorando así la digestión de la quitina. La adaptación del estómago de los mamíferos a la quitina mejora la homeostasis metabólica, lo que constituye una diana terapéutica en enfermedades metabólicas como la obesidad.

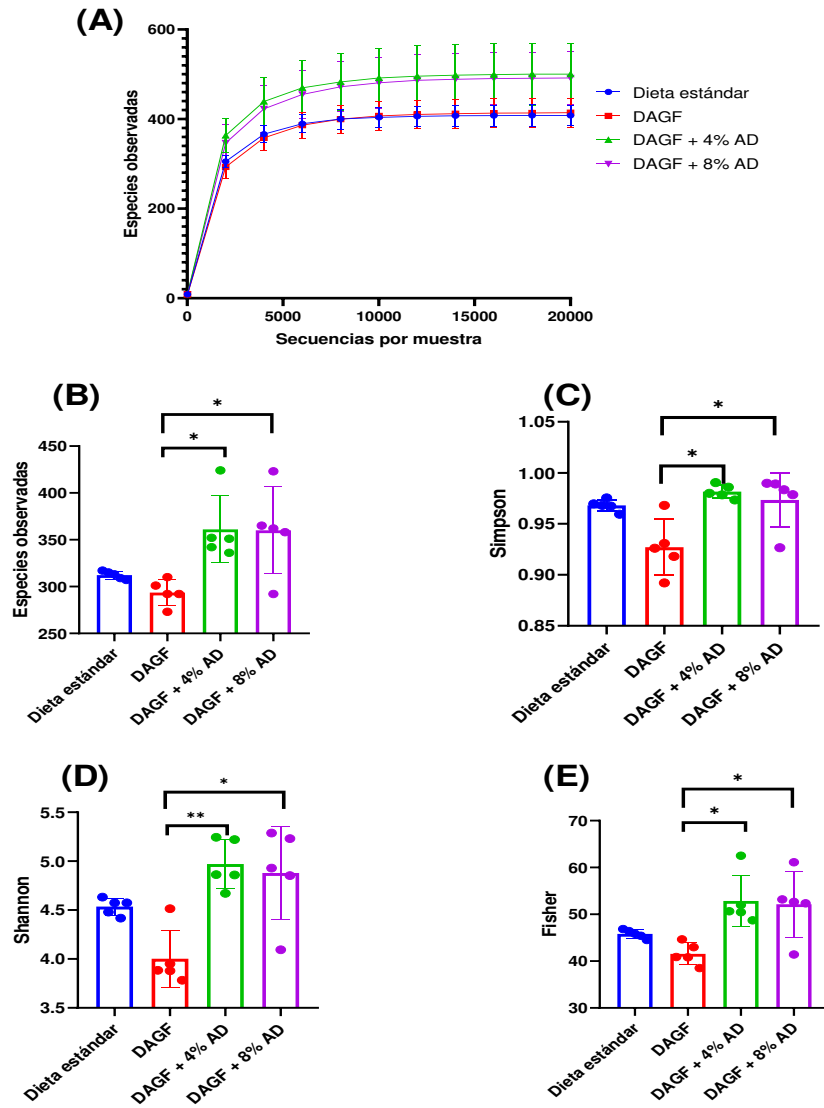


Figura 17. Microbiota fecal de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y en fructosa y suplementada con *Acheta domesticus* (AD) al 4 y al 8 %. Curvas de rarefacción (A). Especies observadas (B). índice de Simpson (C). Shannon (D). Índice de Fisher (E). Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar ($n = 5$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

La beta diversidad hace referencia a la variabilidad en la composición de la microbiota fecal entre distintos individuos. En la obesidad, la beta diversidad de la microbiota fecal hace que haga una separación entre los valores de los individuos sanos. Varios estudios han encontrado una disminución en la diversidad bacteriana y un aumento en la proporción de *Firmicutes* en comparación con *Bacteroidetes* en individuos metabólicamente alterados, lo que correlaciona con un incremento en la inflamación y en la resistencia a la insulina (Castaner et al., 2018).

La beta diversidad se puede medir utilizando diferentes métodos estadísticos y bioinformáticos para evaluar las similitudes y diferencias entre las comunidades microbianas (Maziarz et al., 2018). La Figura 18 muestra un análisis de coordenadas principales de la beta diversidad bacteriana fecal de los diferentes tratamientos, donde destaca que los tres primeros componentes explican aproximadamente el 56% de la variación observada. Por otro lado, se observa una clara separación de los animales alimentados con una dieta estándar con respecto a los animales alimentados con una DAGF con o sin tratamiento.

De acuerdo a Zhang y colaboradores (2012), las dietas ricas en grasas generan cambios en la beta diversidad en comparación con el grupo control sano. Sin embargo, el tratamiento con berberina revirtió parcialmente estos cambios, restaurando la beta diversidad a niveles similares a la de las ratas alimentadas con una dieta estándar. En este estudio no se observaron cambios en la beta diversidad entre los tratamientos con AD a diferentes concentraciones; sin embargo, si se observó una clara separación en el grupo alimentado con una DAGF (Figura 18).

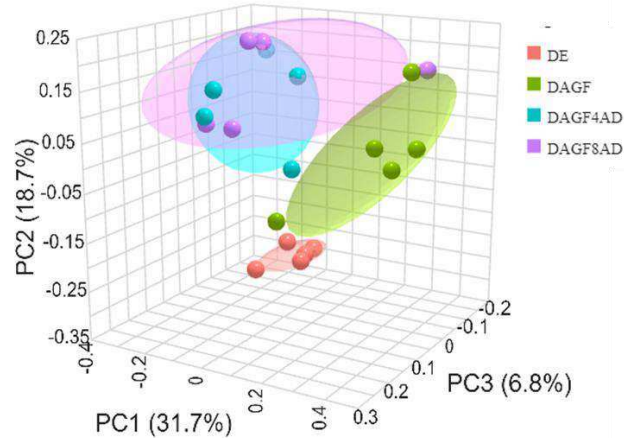


Figura 18. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la beta diversidad por distancias de Bray-Curtis de la microbiota fecal de ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y fructosa (DAGF) y suplementadas con 4 y 8 % de *Acheta domesticus* (AD).

Resultados similares a nuestro estudio fueron reportados por Zhang y colaboradores (2015), quienes evaluaron la beta diversidad de la microbiota fecal en ratas obesas tratadas con berberina y metformina en comparación con ratas obesas no tratadas. Los resultados mostraron que tanto la berberina, como la metformina, mejoraron la estructura general de la microbiota intestinal de las ratas. Ambos tratamientos revirtieron los cambios estructurales inducidos por la dieta rica en grasas en la microbiota fecal.

7.4.2 Abundancia relativa a nivel taxonómico de filo de la microbiota fecal

Al analizar la microbiota intestinal a diferentes niveles taxonómico se utilizan categorías jerárquicas para clasificar los microorganismos en distintos niveles. En cuanto al nivel taxonómico de filo, se han identificado varios filos bacterianos que son comunes en la microbiota intestinal humana. Algunos de los filos bacterianos más abundantes son *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia*. Estos filos comprenden una amplia gama de especies bacterianas

y cada una desempeña funciones específicas en el intestino y en la interacción con nuestro organismo.

Se ha reportado que existe una disminución en la relación de bacterias *Firmicutes/Bacteroidetes* en los individuos obesos. Revisiones de la literatura han reportado que los individuos obesos presentan una mayor proporción de bacterias *Firmicutes* y una menor proporción de bacterias *Bacteroidetes* en comparación con los individuos con peso normal (Magne et al., 2020).

La Figura 19A muestra la abundancia relativa de la microbiota fecal de los diferentes tratamientos experimentales a nivel taxonómico de filos, donde se puede observar que más del 80% de las bacterias encontradas en este experimento corresponden a los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*.

Los dos filos con mayor abundancia fueron *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, numerosos estudios sugieren que el cambio en la composición de estos dos filos puede ser un marcador de "disbiosis" intestinal causada por la obesidad (Magne et al., 2020), las Figuras 19B y 19C muestran la abundancia de estos dos filos.

El filo *Firmicutes* es un grupo de bacterias grampositivas que comprende una amplia variedad de especies presentes en la microbiota intestinal. La importancia de los *Firmicutes* en la microbiota radica en su capacidad metabólica para obtener más energía de los alimentos, no digeribles para el ser humano, lo que podría contribuir al desarrollo de la obesidad (Magne et al., 2020). Por lo tanto, se ha reportado que su incremento está asociado con la obesidad, consistente con nuestros resultados presentados en la Figura 19B, donde el tratamiento con una DAGF presenta un incremento estadísticamente significativo ($P < 0.05$) de la abundancia de *Firmicutes* comparado con el grupo DE, sin embargo, los grupos alimentados con dieta suplementada con AD no presentaron una reducción significativa de la abundancia de *Firmicutes*.

Según lo reportado por Harsch y colaboradores (2018), las bacterias *Clostridiales*, pertenecientes al filo *Firmicutes*, abundan en individuos obesos con dietas hipercalóricas. Estos grupos bacterianos pueden estar implicados en una

mayor capacidad metabólica de extraer energía de la fracción no digerible de la dieta y en última instancia, al desarrollo de la obesidad. Se ha sugerido que ciertas bacterias *Firmicutes* tienen la capacidad de degradar componentes de la dieta que otros grupos bacterianos no pueden, lo que les permite producir metabolitos que promueven la síntesis *de novo* de ácidos grasos y la acumulación de tejido adiposo. Algunas especies de *Firmicutes* pueden disminuir la síntesis en la producción de algunos ácidos biliares, lo que puede afectar al metabolismo lipídico y a la regulación de la glucosa (Lee et al., 2022).

Los *Bacteroidetes* son un filo de bacterias Gram negativas que están ampliamente distribuidas en diversos entornos. En el contexto de la microbiota intestinal, los *Bacteroidetes* representan uno de los principales grupos bacterianos presentes en el colon. Los *Bacteroidetes* están adaptados para degradar una amplia variedad de sustratos, incluidos polisacáridos complejos y componentes de la dieta que son resistentes a la digestión humana. Este filo está inversamente asociado con el índice de masa corporal (IMC) y otros marcadores de obesidad, así como asociado positivamente con dietas altas en fibra dietaria (Magne et al., 2020).

En este sentido, se ha sugerido que los cambios en la dieta, como una ingesta elevada de grasas y azúcares, pueden promover el crecimiento de otros grupos bacterianos en detrimento de los *Bacteroidetes*. Además, se ha observado que en la obesidad se promueven el crecimiento de bacterias patógenas intestinales, en detrimento de *Bacteroidetes*, estas bacterias secretan endotoxinas e incrementan la permeabilidad intestinal favoreciendo la inflamación crónica (Zafar et al., 2021).

Los miembros del filo *Bacteroidetes* muestran una notable diversidad en varios niveles de resolución, aunque comparten características distintivas que subrayan su ascendencia común. Su composición genómica revela una capacidad excepcional para utilizar eficazmente los polisacáridos. Esta notable capacidad permite a estas bacterias interactuar con una amplia gama de glicanos, lo que las hace especialmente adecuadas para un huésped omnívoro con una dieta diversa (Jhonson et al., 2017).

Las ratas con dietas suplementadas con un 4 y 8% de harina de grillo mostraron un aumento estadísticamente significativo ($P < 0.01$) en la abundancia de *Bacteroidetes* en comparación con los animales alimentados sólo con la DAGF (Figura 19). Este incremento puede estar asociado con el contenido de fibra, en particular la quitina y otros compuestos no digeribles como las proteínas, que llegan al intestino grueso y son fermentados por la microbiota, aumentando así la abundancia del filo *Bacteroidetes*. Además, es interesante observar que, independientemente del consumo de grillo evaluado en este estudio, se observa un aumento similar en el filo *Bacteroidetes*, lo que podría sugerir una saturación de la fermentación en las condiciones de estudio evaluadas, lo que concuerda con los resultados de alfa y beta diversidad presentados anteriormente.

López-Santamarina y colaboradores (2020) han sugerido que los carbohidratos no digeribles, como la quitina, llegan al intestino grueso y son fermentados por la microbiota, promoviendo el crecimiento de bacterias del filo *Bacteroidetes*. Se ha propuesto que estos microorganismos tienen la capacidad de degradar y utilizar la quitina como fuente de energía, lo que conduce a un aumento de su abundancia. Además, se ha demostrado que la fermentación de la quitina por las bacterias *Bacteroidetes* produce metabolitos beneficiosos, como los ácidos grasos de cadena corta, los cuales se asocian a efectos positivos sobre la salud intestinal y la regulación del peso corporal.

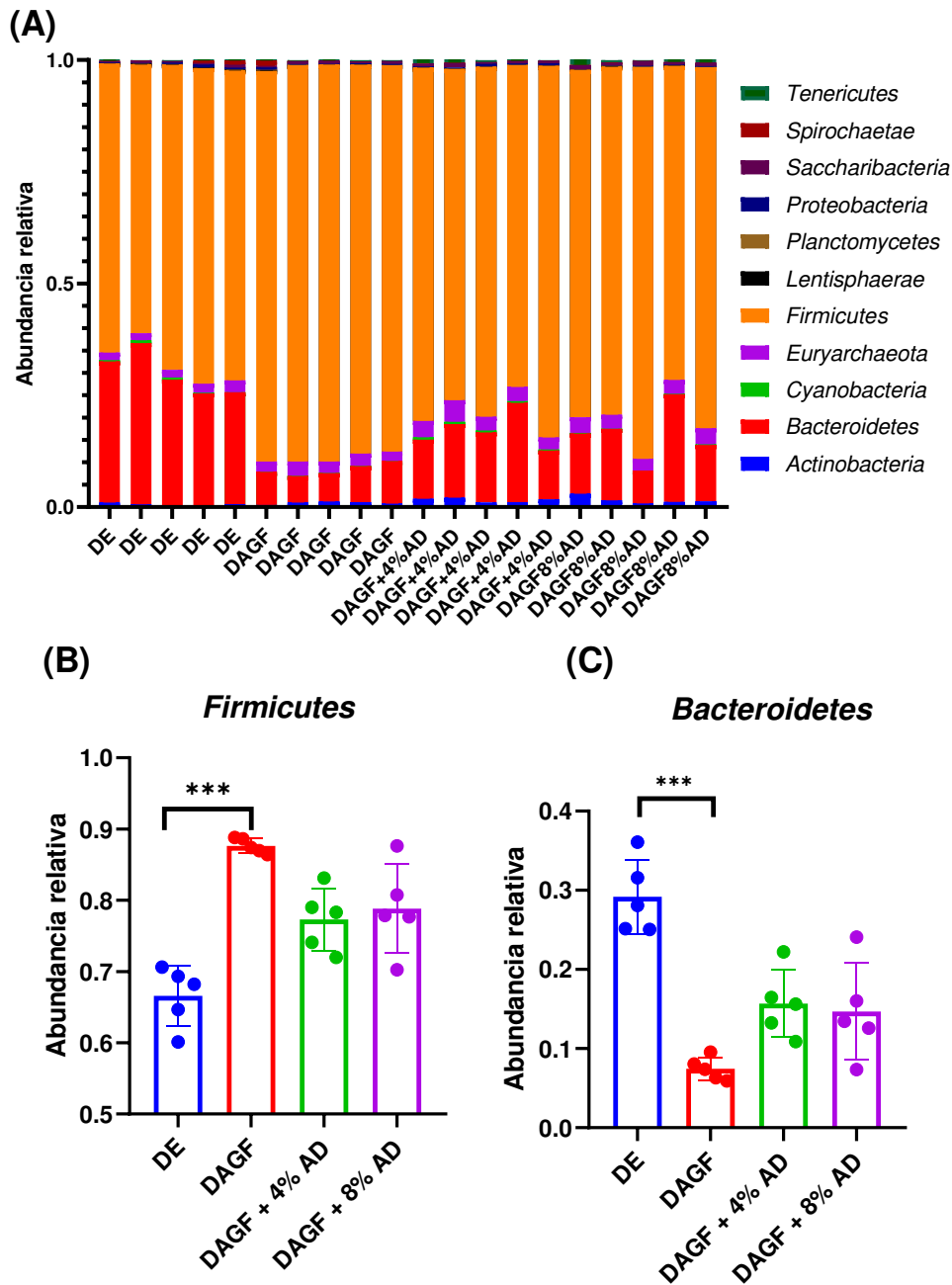


Figura 19. Abundancia relativa a nivel de filo de la microbiota fecal de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y fructosa (DAGF) y suplementadas con 4 y 8% de AD (A). Abundancia de los filos Firmicutes (B) y Bacteroidetes (C). Las barras indican la media \pm desviación estándar ($n = 5$). *** $p < 0.001$ mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

Se realizó el análisis Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe) para identificar las familias bacterianas clave que presentaban cambios en los distintos grupos experimentales (Figura 20). El análisis LEfSe es una herramienta estadística utilizada en estudios de microbiota para identificar biomarcadores microbianos que difieren significativamente entre distintos grupos o condiciones. LEfSe combina el análisis discriminante lineal con el tamaño del efecto para determinar las características microbianas más relevantes y distintivas asociadas a cada grupo.

En el análisis Lefse, bacterias como *Prevotellaceae* se identificaron como marcadores de animales alimentados con una dieta rica en grasas y la familia Clostridiaceae se asoció con animales alimentados con una dieta rica en fructosa. Además, las familias *Peptococcaceae* y *Ruminococcaceae* se identificaron como marcadores microbianos clave para los grupos suplementados con grillo al 4 y 8 %, respectivamente.

Se eligieron seis familias bacterianas en base al análisis LEfSe para determinar sus variaciones en términos de abundancia relativa individual, como se muestra en la Figura 21. En cuanto a la familia *Prevotellaceae*, se observó una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.001$) en los animales alimentados con una DAGF en comparación con los alimentados con una DE. Mientras tanto, en los grupos suplementados con grillo al 4 y 8 %, independientemente del consumo a partir de la dieta, se observó un aumento de la abundancia de esta familia bacteriana ($P < 0.01$) en comparación con los animales alimentados únicamente con una DAGF.

De acuerdo a lo reportado por Karlsson y colaboradores (2013), mujeres suizas de 63 años con respuesta normal a la prueba oral de tolerancia a la glucosa, tienen una mayor abundancia de la familia bacteriana *Prevotellaceae* en la microbiota intestinal en comparación con el grupo de mujeres suizas de 63 años de edad que fueron catalogadas como intolerantes a la glucosa.

Por otro lado, el aumento observado en la abundancia de la familia bacteriana *Prevotellaceae* en los animales que consumieron grillos puede atribuirse al contenido de fibra en este insecto. Varios estudios han evaluado la capacidad de

las bacterias *Prevotellaceae* para fermentar hidratos de carbono complejos. En este sentido, Kovatcheva-Datchary y colaboradores (2015) realizaron un estudio de intervención evaluando el consumo de pan integral a base de cebada con alto contenido de fibra encontraron un aumento en la familia *Prevotellaceae*, la cual se asocia con una mejora en el metabolismo de la glucosa. Además, un tratamiento con inulina en ratones genéticamente propensos para desarrollar obesidad, genero un incremento en la abundancia de *Prevotellaceae* y se correlacionó negativamente con parámetros de lípidos en sangre (Song et al., 2019).

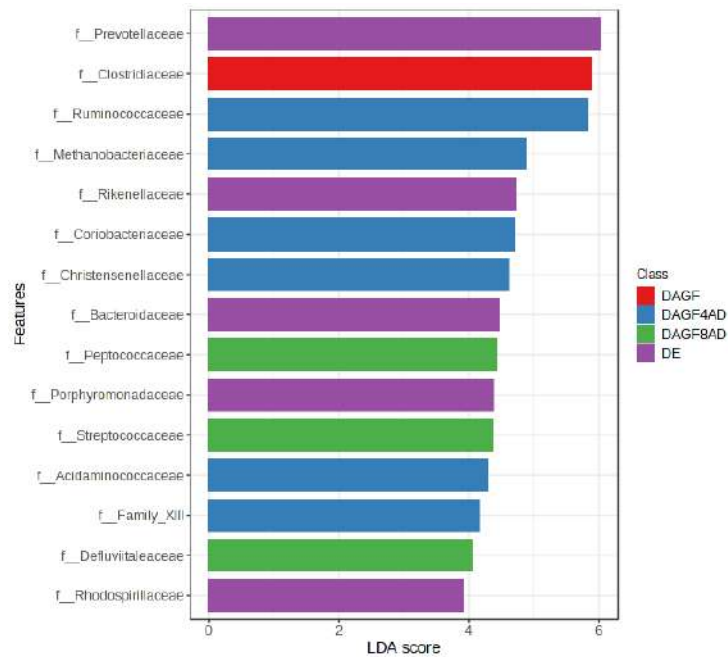


Figura 20. Análisis Lefse (LDA Effect size) a nivel familia de la microbiota fecal de ratas alimentadas con una DAGF suplementada con *Acheta domesticus* (AD) al 4 y 8%.

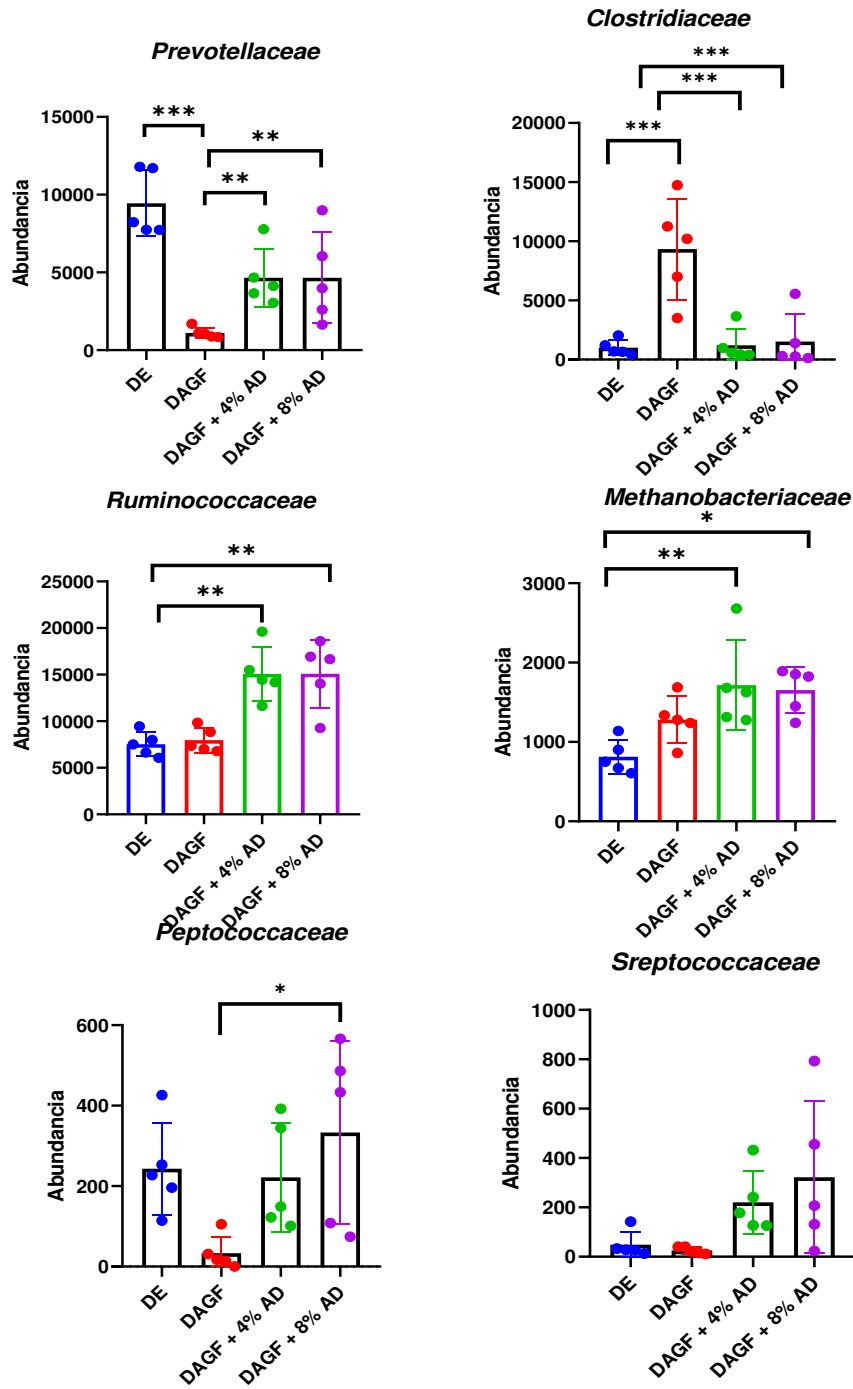


Figura 21. Abundancia relativa de familias de la microbiota fecal de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y fructosa (DAGF) y suplementadas con 4 y 8% de AD. Las barras indican la media \pm desviación estándar ($n = 5$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ mediante la prueba de Tukey.

Otra familia bacteriana que incrementó significativamente en los grupos alimentados con una DAGF fue la *Clostridiaceae*, en comparación con el grupo DE ($p < 0.001$). Por el contrario, los animales tratados con grillo mostraron una disminución de esta familia comparado con la abundancia de *Clostridiaceae* del grupo alimentado con la DAGF ($p < 0.001$).

Gomes y colaboradores (2018) realizó un meta análisis de la composición de la microbiota intestinal en individuos con obesidad y encontraron un aumento significativo en la abundancia de *Clostridiaceae* en comparación con individuos de peso normal. Este aumento se asoció con un incremento en el metabolismo de los lípidos y el desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad y la resistencia a la insulina. Si bien algunas cepas de la familia *Clostridiaceae* pueden producir toxinas y metabolitos nocivos para el hospedador, el impacto negativo de la familia *Clostridiaceae* depende de la especie y la cepa, así como de las condiciones del hospedador y del equilibrio de la microbiota intestinal (Gomes et al., 2018).

La adición de grillos a la DAGF provocó un aumento de *Ruminococcaceae*, ($P < 0.05$) en comparación con los valores de *Ruminococcaceae* del grupo DAGF. Se han encontrado asociaciones entre una mayor abundancia de *Ruminococcaceae* y una disminución de la hipertensión, así como un menor riesgo de obesidad y diabetes tipo 2. Las *Ruminococcaceae* se han relacionado con el consumo a largo plazo de frutas y verduras y su presencia se ha asociado con una menor prevalencia de hipertensión y un estado antiinflamatorio (Song et al., 2023).

Por otro lado, en la figura 15, se observó un patrón interesante en la familia *Methanobacteriaceae* en los animales alimentados con una DAGF, ya que aumentó su abundancia relativa en comparación con la de los alimentados con una dieta estándar. En los animales que recibieron harina de grillo al 8% en la DAGF se produjo un aumento adicional de la abundancia de esta familia en comparación con el control obeso.

Ruaud y colaboradores (2020) que la abundancia de *Methanobacteriaceae* ha correlacionado negativamente con un estado de obesidad y alteraciones

metabólicas. Además, se encontró que estas bacterias están asociadas con *Christensenellaceae*, que son bacterias productoras de H₂. Este hidrógeno es capturado por las bacterias productoras de metano, lo que favorece la presencia de *Methanobacteriaceae* que, a su vez, reducen la fuente de energía disponible para el huésped a través de la pérdida de carbono en forma de metano. Además, las *Methanobacteriaceae* promueven la degradación de polisacáridos complejos, lo que conduce a un aumento de las bacterias productoras de acetato. En nuestro estudio, los animales alimentados con una DAGF suplementada con harina de grillo mostraron una mayor abundancia de la familia *Christensenellaceae*.

En nuestro estudio se observó un comportamiento interesante en la familia *Streptococcaceae*, cuyos niveles se mantuvieron similares en los animales alimentados con la DE y la DAGF; sin embargo, su abundancia incrementó cuando se incluyó harina de AD en la DAGF. Se ha observado que las especies de esta familia, como *Streptococcus thermophilus*, poseen una elevada capacidad de degradación de derivados de la quitina, incluidos los oligosacáridos de quitina. Además, *Streptococcus thermophilus* se ha relacionado con la reducción de la inflamación en ratones con septicemia (Mao et al., 2013; Han et al., 2020).

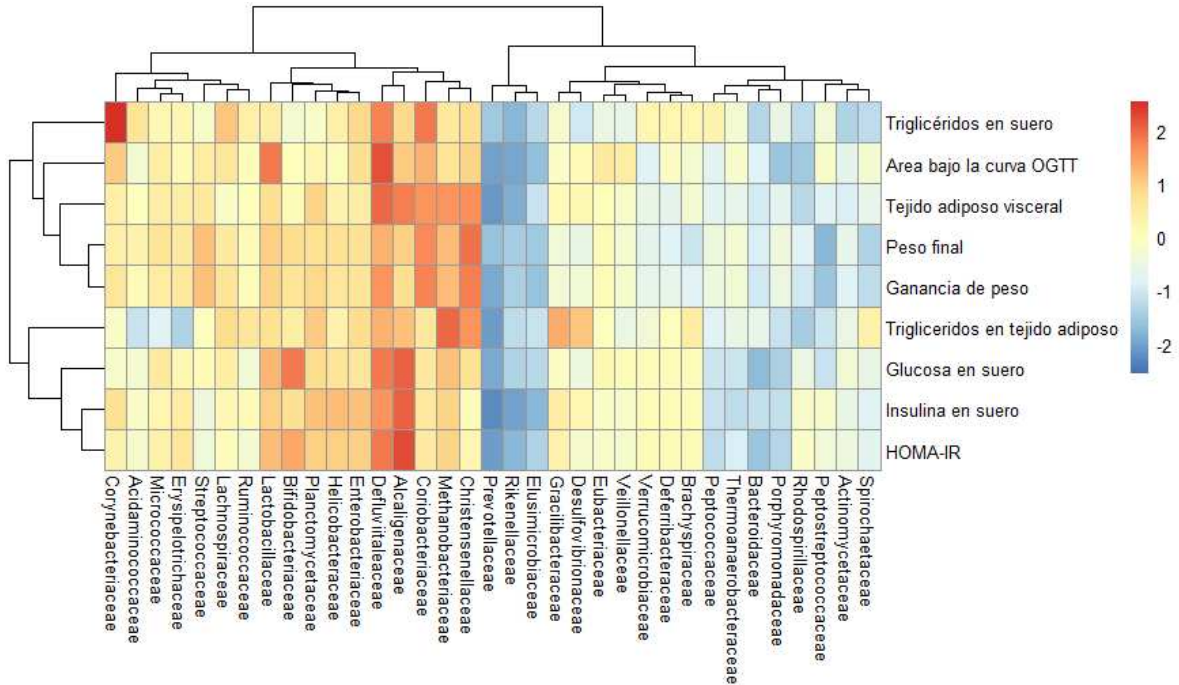


Figura 22. Heatmap de análisis de agrupamientos de correlaciones de familias bacterianas en heces de ratas alimentadas con una DAGF suplementada con AD al 4 y al 8% y parámetros metabólicos asociados a la obesidad.

En la figura 22, se muestra un análisis de agrupamientos a partir de una correlación de Pearson, donde se correlaciona la abundancia relativa de las familias bacterianas de la microbiota fecal y los parámetros metabólicos y fisiológicos de ratas alimentadas con una DAGF y suplementada con harina de grillo al 4 y al 8%.

Respecto a las familias bacterianas que correlacionaron positivamente con los valores de parámetros metabólicos y fisiológicos relacionados con la obesidad y los cuales se muestran en color rojo, destaca la familia *Alcaligenaceae*, la cual es una familia bacteriana que pertenece al filo de las *Proteobacterias*, bacterias que frecuentemente se asocian con una mayor prevalencia de enfermedades metabólicas (Rizzatti et al., 2019). Por otro lado, las familias bacterianas que mostraron una mayor asociación negativa con los parámetros de metabólicos y fisiológicos relacionados con la obesidad y los cuales se muestran en color azul, fue la familia *Prevotellaceae*, la cual como se mencionó anteriormente, su abundancia relativa se correlaciona con dietas altas en fibra y en menor inflamación sistémica y reducción en los niveles de lípidos y glucosa (Song et al., 2019).

De acuerdo a los resultados observados en la figura 22, se concluye que la inclusión de harina de grillo en la DAGF genera cambios importantes en el perfil bacteriano fecal de los animales tratados, sobre todo un incremento en bacterias consideradas como beneficiosas y una reducción de bacterias relacionadas con un fenotipo relacionado con la obesidad y sus complicaciones. Ambos grupos alimentados con dietas suplementadas con AD al 4 y 8 %, independientemente de su concentración, generaron cambios similares, resultados no concordantes con los parámetros bioquímicos, ya que para la resistencia a la insulina solamente los animales tratados con AD al 8 % muestran una mejora en el índice HOMA-IR. Por lo tanto, los beneficios inducidos por *Acheta domesticus* podrían relacionarse parcialmente a los cambios en la microbiota.

7.5 Análisis metabólico del contenido intestinal de ratas alimentadas con una DAGF y *Acheta domesticus*

Para una comprensión más profunda del proceso digestivo de la harina de AD en los animales que consumieron la DAGF su efecto en el metabolismo e interacción con la microbiota se realizó un análisis metabólico por UPLC-ESI-MS-QToF del contenido cecal de los animales del presente estudio. El estudio metabólico del contenido intestinal puede proporcionar información valiosa sobre la función metabólica de los microorganismos intestinales y su relación con la salud. Así mismo, la metabolómica permite identificar metabolitos específicos que podrían tener efectos beneficiosos o perjudiciales para el hospedero, lo que puede ayudar a comprender mejor los mecanismos de las interacciones entre la microbiota intestinal y el metabolismo.

Para el análisis de datos del estudio metabólico, primero se realizó un alineamiento de los cromatogramas, posteriormente se realizó una deconvolución manual de los cromatogramas separando los compuestos de posibles señales derivadas de las señales del ruido instrumental por su forma cromatográfica, su distribución isotópica y su patrón de fragmentación.

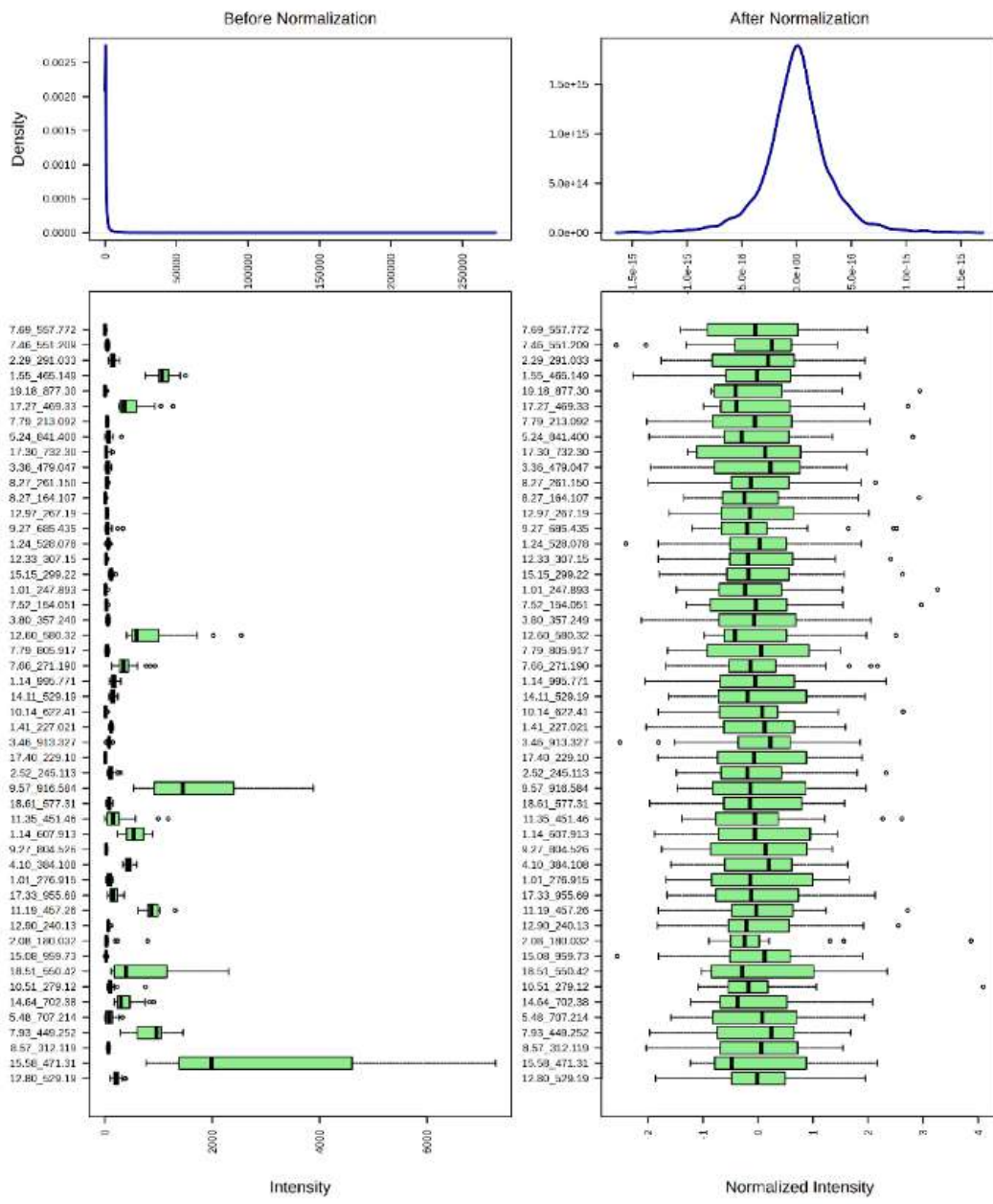


Figura 23. Diagramas de caja y gráficas de densidad de compuestos encontrados en análisis metabólico en el colon antes y después de filtrar, normalizar y escalar los datos.

En el presente estudio, de los 7,121 picos cromatográficos detectados (mz/rt), 2847 fueron removidos por no considerarse como picos cromatográficos, 421 no tuvieron una distribución isotópica y 16 picos no presentaron fragmentación. Por lo tanto, los análisis se llevaron a cabo únicamente con una matriz con 3837 picos cromatográficos, los cuales se analizaron en la plataforma Metaboanalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>) con el fin de normalizar los datos y buscar las diferencias estadísticas entre los tratamientos. Se seleccionaron los metabolitos que fueron diferentes entre los grupos, los cuales posteriormente se identificaron para llevar a cabo la interpretación biológica.

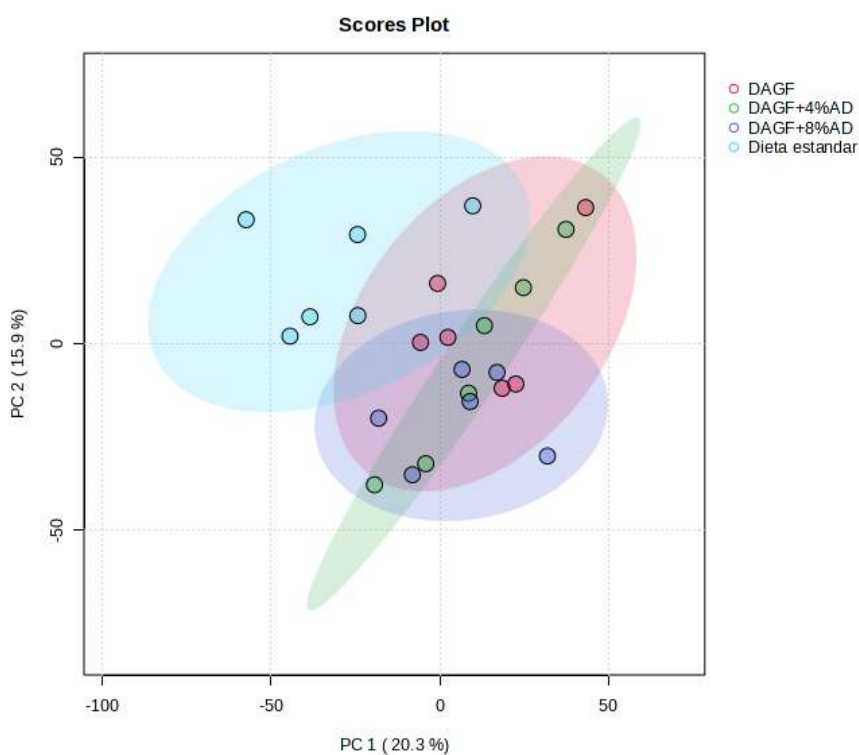


Figura 24. Análisis de componentes principales (PCA) de los metabolitos del contenido intestinal de ratas alimentadas con una DAGF y suplementada con *Acheta domesticus* (AD) al 4 y 8%.

Para el procesamiento de los datos se eliminaron los compuestos que presentaron un 50 % de valores sin señal, además, los datos se normalizaron por el método de

cuartiles y transformados por la raíz cuadrada. Finalmente, los datos se sometieron a un escalado con el método de auto escalamiento. En la Figura 23 se muestran los diagramas de caja y gráficas de densidad de compuestos encontrados en el análisis metabolómico antes y después de ser normalizados. La normalización y el escalado generaron una distribución tipo gaussiana, lo que permite el posterior análisis de forma adecuada.

Para identificar si existe una separación de acuerdo al perfil de metabolitos de los diferentes grupos en estudio, se realizó un análisis de componentes principales PCA (Figura 24). Para los estudios exploratorios donde las diferencias metabolómicas entre los grupos experimentales pueden ser desconocidas o impredecibles, el análisis inicial por PCA proporciona una primera información de la estructura del conjunto de datos y las relaciones entre los grupos. Incluso cuando la estructura del conjunto de datos puede ser predecible, el uso inicial de métodos imparciales como PCA proporciona una confirmación adicional antes del análisis mediante métodos supervisados.

En la Figura 24 se muestra el análisis de componentes principales donde los dos primeros componentes explican aproximadamente un 36% de la variación de los datos. En cuanto al componente 1 se aprecia una tendencia a la separación entre el grupo DE y los grupos tratados con harina de grillo al 4 y 8 %, ubicándose en medio el grupo alimentado con una DAGF. En el componente 2 (15% de la variación explicada) existe una tendencia a la separación entre el grupo DAGF y los grupos DE y 8 % AD , destacando que el grupo suplementado con 8% de AD fue el que tuvo un mayor efecto biológico benéfico en la DAGF. A pesar de la poca variación que explica este análisis de componentes principales (PCA) y que no existe una separación clara entre los grupos, hay una tendencia a la separación entre grupos experimentales. Lo anterior sugiere posibles cambios el perfil de metabolitos colónicos. Por lo anterior, se realizó a un análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA).

El análisis PLS-DA del metaboloma derivado del contenido intestinal de las ratas se muestra en la Figura 25 y los resultados de validación en el Anexo 4. El PLS-DA es

un método estadístico comúnmente utilizado en la metabolómica para analizar datos de alta dimensión e identificar patrones o diferencias entre grupos. Así mismo, PLS-DA es una técnica estadística multivariante supervisada que combina características de análisis de componentes principales (PCA) y regresión lineal múltiple (Gromski et al., 2015). En el anexo 4 se muestra que con dos componentes se tienen valores de Q2 mayores a 0.6 lo que indica una buena capacidad del modelo predictivo.

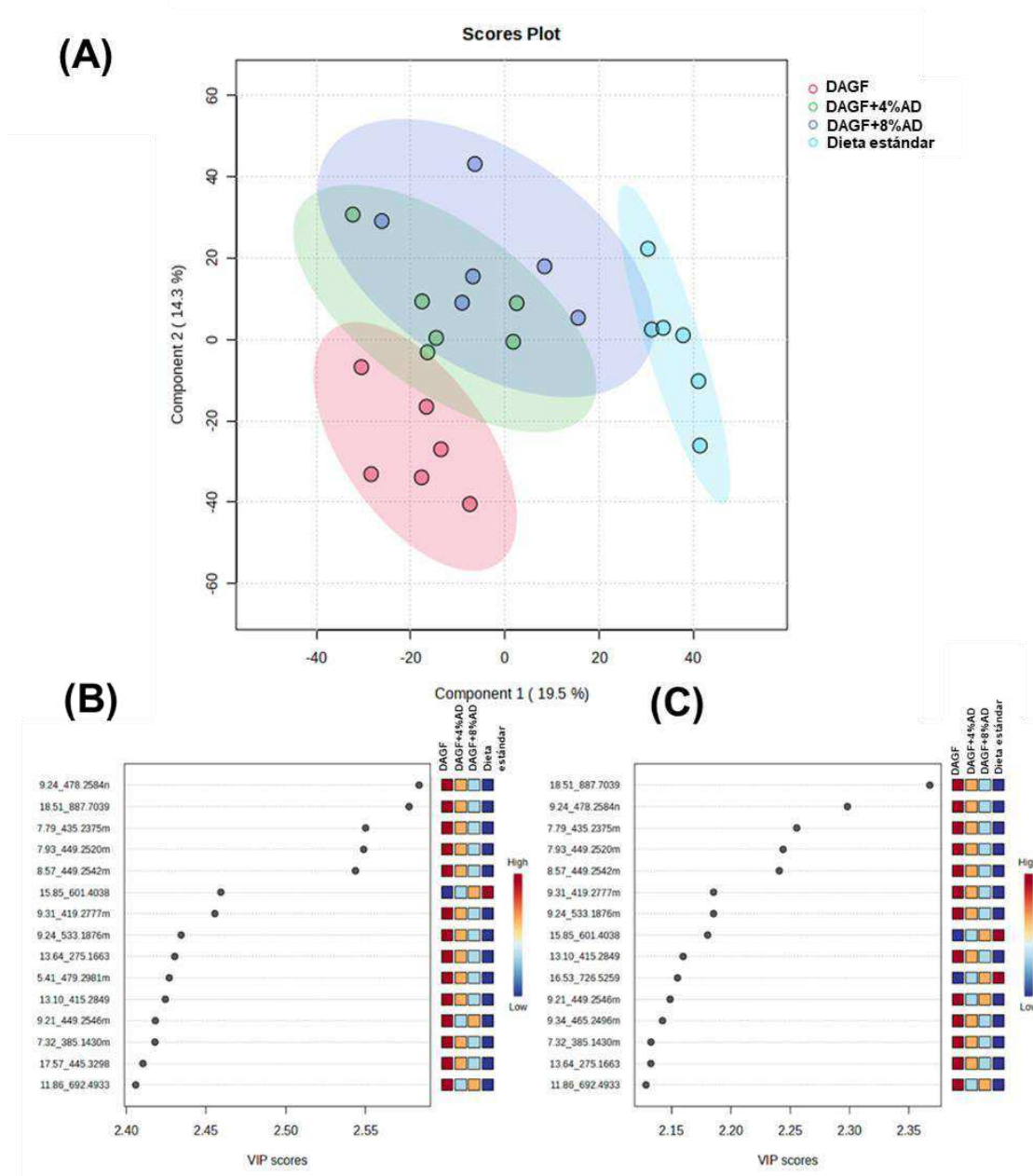


Figura 25. Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) del metaboloma derivado del contenido intestinal de ratas alimentadas con una DAGF y suplementada con *Acheta domesticus* (AD) al 4 y 8 % (A). Importancia de la variable en el PLS-DA (VIP score) responsable de la discriminación y sus puntuaciones para los componentes 1 (B) y 2 (C).

En la Figura 25 se observa que los grupos DAGF y DE se encuentran en lados opuestos del componente 1, encontrándose los tratamientos en medio de ambos, interesantemente el tratamiento que espacialmente se colocó más próximo al grupo DE fue el 8 % AD, este grupo mostró la mejoría más importante de los parámetros alterados asociados a la obesidad. Como lo fue la resistencia a la insulina y los niveles de lípidos hepáticos.

En la Figura 26 se muestran los cuatro metabolitos con un valor de VIP score más alto en el análisis de PLS-DA, donde las mayores abundancias de estos metabolitos se presentan en el grupo DAGF y de manera interesante, ambos grupos tratados con grillo muestran menor concentración de estos compuestos, sin embargo, no se presentó una diferencia significativa de este la disminución de la abundancia de estos metabolitos.

Algunos metabolitos como el 18.51_887.70m/z, se presentó una reducción de hasta el 50% en el grupo 8% AD comparado con el control obeso. En la última etapa de este proyecto estos y otros metabolitos fueron identificados para realizar una interpretación biológica. Se ha reportado que algunos de los metabolitos incrementados en el colon de animales alimentados con la DAGF provienen de las bacterias intestinales y estos se relacionan con complicaciones asociadas a la obesidad, como los ácidos grasos de cadena corta, los lipopolisacáridos, el indol y los aminoácidos de cadena ramificada (Agus et al., 2016).

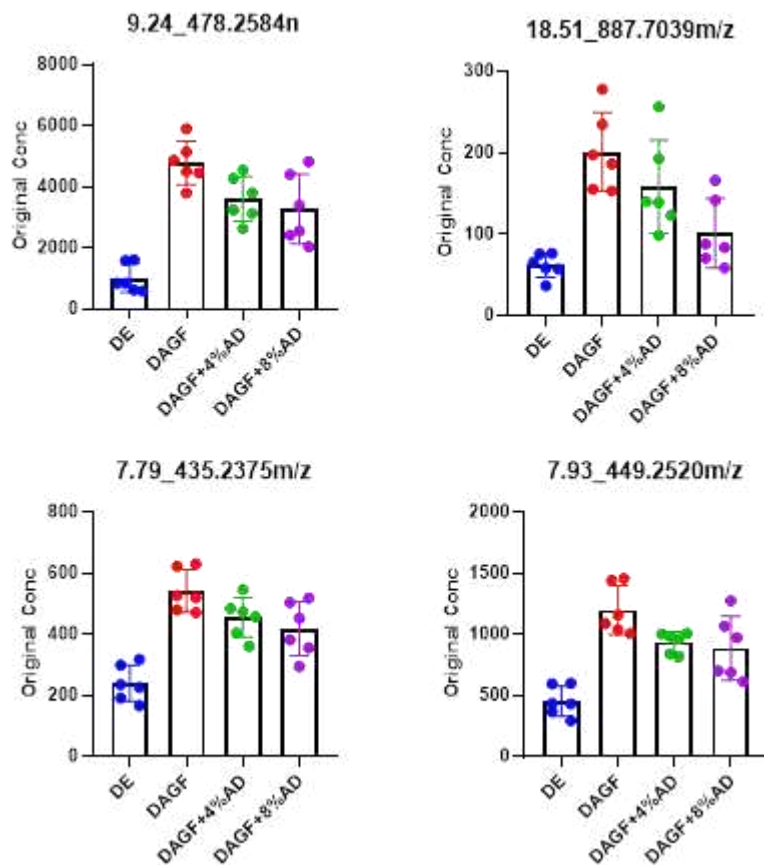


Figura 26. Área relativa de las cuatro principales variables responsables de la discriminación en el PLS-DA del metaboloma obtenido del contenido intestinal de ratas alimentadas con una DAGF y suplementada con *Acheta domesticus* (AD) al 4 y 8 %. Las barras indican la media \pm desviación estándar (n = 6).

El análisis SPLSDA (Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis) es una técnica estadística utilizada en metabolómica para el análisis de datos multivariados. SPLSDA combina dos métodos principales: Análisis de Componentes Principales Parciales (PCA) y Análisis de Regresión Parcial de Mínimos Cuadrados (PLS-DA). A diferencia del análisis PLS-DA tradicional, SPLSDA tiene la ventaja de seleccionar automáticamente un subconjunto relevante de variables (metabolitos) que están más relacionadas con la variable de respuesta. Esto se analiza a través de la introducción de una restricción de sparsity (dispersión) en el modelo, lo que significa que solo un subconjunto de variables es seleccionado y considerado importante para la clasificación (Cao et al., 2011). Se estimó la tasa

de error del análisis SPLS-Da en función del número de componentes, lo que se muestra en el anexo 5, donde al mostrar dos componentes solamente se tiene una tasa de error del 20%, por lo que se procedió con el análisis.

En el presente trabajo para la construcción del análisis SPLSDA se seleccionaron los 15 compuestos más relevantes para la clasificación y construcción del análisis, los cuales se muestra en la Figura 27, donde se aprecia una clara separación de las muestras con las del grupo alimentados con la DAGF y la DE. Adicionalmente, los grupos tratados con grillo presentaron una ligera separación entre ambas concentraciones de grillo evaluadas. Además, se presentan los compuestos más importantes que marcan una separación,

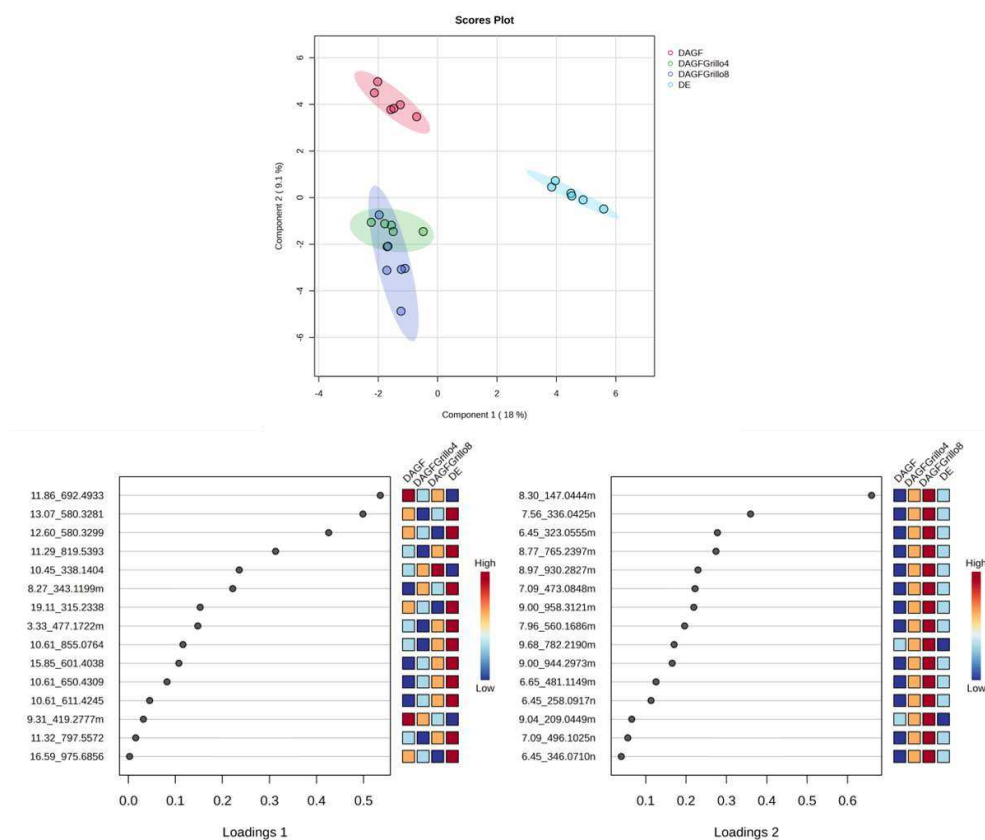


Figura 27. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales dispersos (sPLSDA) del metaboloma obtenido del contenido intestinal de ratas alimentadas con una DAGF y suplementada con *Acheta domesticus* (AD) al 4 y 8 % (A).

Importancia de la variable en el sPLS-DA (VIP score) responsables de la discriminación y sus puntuaciones para los componentes 1 (B) y 2 (C).

Por último, para identificar los compuestos que marcan una diferencia estadísticamente significativa, se realizó un Volcán Plot, el cual se muestra en la Figura 28. El Volcan Plot es una herramienta gráfica ampliamente utilizada en metabolómica para visualizar y analizar datos de perfiles metabólicos. Su objetivo principal es identificar metabolitos que sean estadísticamente significativos en términos de cambios en su abundancia entre diferentes grupos o condiciones experimentales.

De acuerdo a la Figura 28, de los 8000 metabolitos intestinales que se encontraron al inicio de este análisis, tras el proceso de filtración, selección de picos y deconvolución, solamente se seleccionaron 3265 de los cuales sólo 66 mostraron un valor P inferior a 0.05 del recuento en la prueba paramétrica de Kruskal-Wallis en una comparación entre los grupos experimentales. Este análisis sugiere que estos 66 metabolitos pueden proponerse ser identificados para predecir las vías metabólicas que están siendo reguladas y obtener así una interpretación biológica.

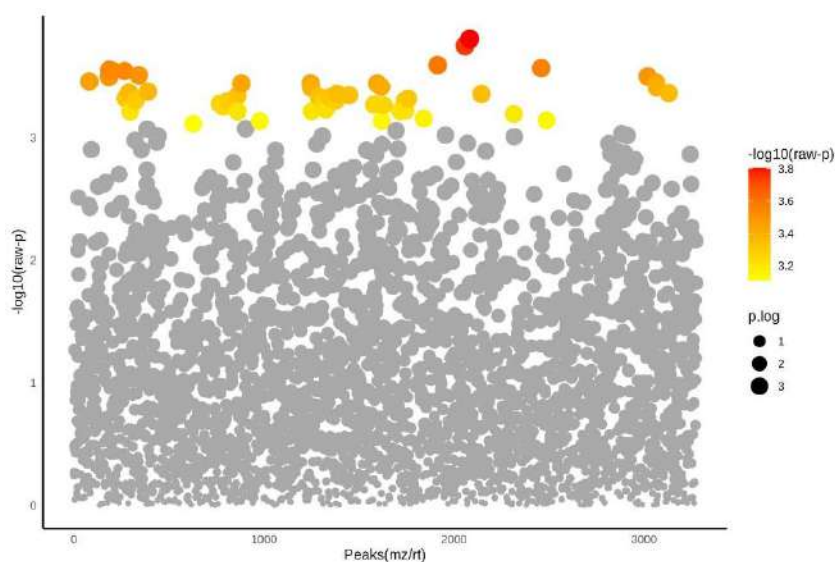


Figura 28. Volcan plot de metabolitos y su poder de discriminación por la prueba de Kruskal-Wallis, del metaboloma obtenido del contenido intestinal de ratas alimentadas con una DAGF suplementada con *Acheta domesticus* (AD) al 4 y 8 %.

En la Figura 29 presentan los 5 metabolitos que mostraron un P valor menor, de acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis, al comparar los diferentes grupos experimentales. Para alguno de estos metabolitos, los grupos alimentados con la DE y DAGF presentan valores muy bajos, casi imperceptibles comparados con los grupos suplementados con grillo. Además, es interesante que la abundancia de estos metabolitos incrementó conforme fue mayor la concentración de grillo en la dieta. Por lo que es posible que estos metabolitos sean derivador de la fermentación los compuestos no digeribles del grillo, como los carbohidratos complejos y las proteínas no digeribles.

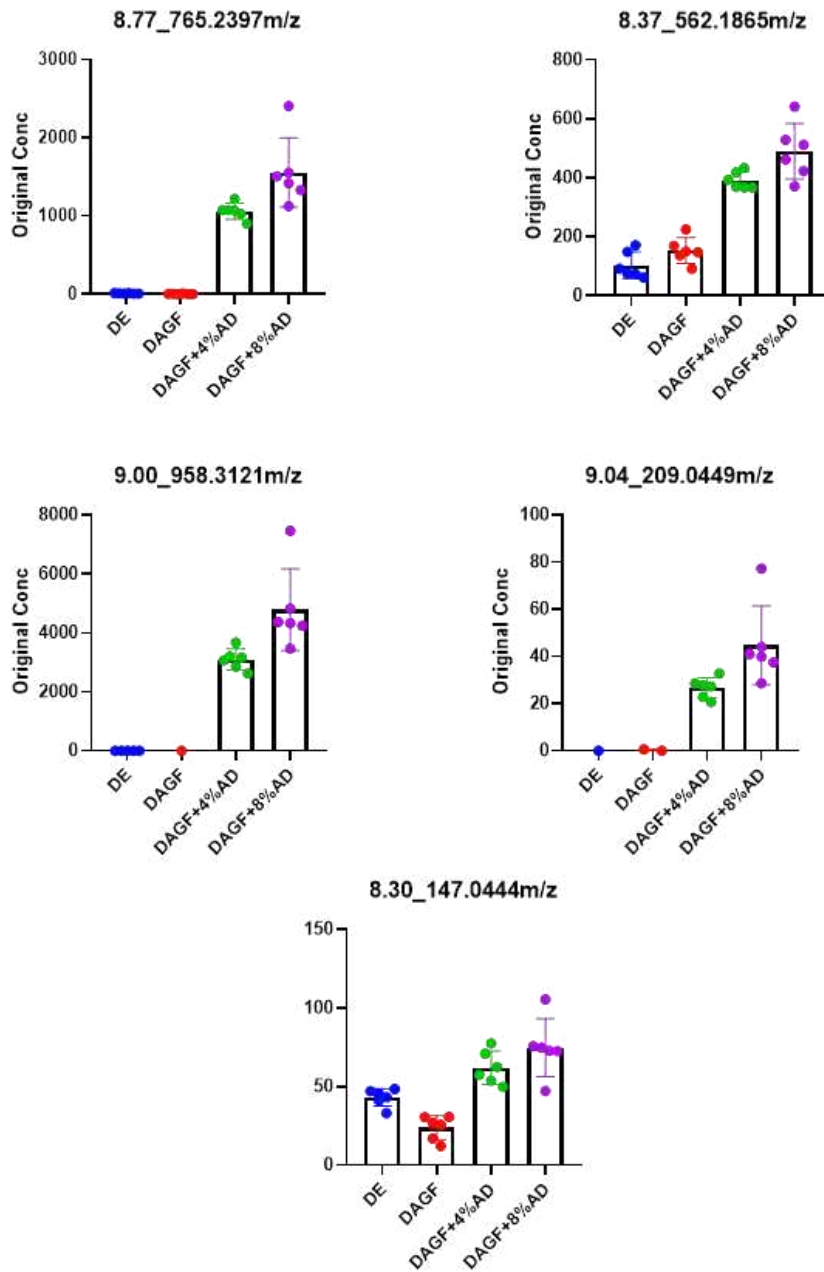


Figura 29. Área relativa de los principales metabolitos con una mayor diferencia estadística significativa entre los 4 tratamientos experimentales del metaboloma obtenido del contenido intestinal de ratas alimentadas con una DAGF suplementada con *Acheta domesticus* (AD) al 4 y 8 %. Las barras indican la media \pm desviación estándar (n = 6).

Se los 5 metabolitos con una mayor puntuación en el VIP-SCORE en el análisis PLS-DA para su identificación, junto con los 66 metabolitos que mostraron diferencias significativas entre tratamientos en el diagrama de volcán. La identificación putativa se llevó a cabo utilizando el software Progenesis Q1 de Waters Company (Massachusetts, EE.UU.). Los patrones de fragmentación se compararon con los de KEGG, Lipidmaps, Human Metabolome Database y Serum Metabolome Database, empleando una tolerancia de 10 ppm del ion molecular y de los fragmentos.

Entre los 14 metabolitos identificados putativamente que se muestran en el cuadro 7, el compuesto 1 se ha descrito como un subproducto de la degradación microbiana del bisfenol A (Narayanan et al., 2022). Este compuesto está reconocido como un potente disruptor endocrino relacionado con la obesidad, la resistencia a la insulina y la inflamación (Li et al., 2022).

En el cuadro 8 se muestran las abundancias relativas promedio de los 14 metabolitos que se logró realizar una identificación putativa. En el cuadro 8 se muestra que respecto al compuesto 1 los tratamientos con AD en la DAGF aumentaron la abundancia de este metabolito de degradación en el contenido cecal. Así, aunque la exposición potencial al bisfenol A en este experimento sigue siendo desconocida, la identificación de una mayor presencia de este producto de degradación en el contenido cecal podría considerarse un hallazgo positivo.

Un resultado inesperado tiene que ver con el compuesto 2, identificado como ácido fenilpirúvico, un metabolito derivado de la fenilalanina y asociado a enfermedades cardiovasculares en ciertos estudios (Chen et al., 2023). De acuerdo al cuadro 8, este metabolito no se detectó en los grupos alimentados con DE y DAGF. Sin embargo, en los grupos suplementados con 4 y 8 % de harina de grillo se observó este compuesto en el contenido cecal, incrementando su concentración a medida que aumentaba la cantidad de grillo en la dieta. Una posible explicación es que la harina de grillo tiene una concentración de fenilalanina de 2.38 g/100 g (Udomsil et al., 2019) y parte de esta proteína, al unirse a la quitina, no es digerida en el intestino delgado y es fermentada por la microbiota intestinal.

El compuesto 3 se identificó como fosfatidiletanolamina, un componente primario de las membranas celulares bacterianas (Zhang et al., 2022). Estudios recientes han sugerido que la suplementación con etanolamina, el principal constituyente de la fosfatidiletanolamina, mejora la capacidad antioxidante intestinal (Zhou et al. 2018).

Los compuestos 4, 5, 7 y 11 correspondieron a derivados de ácidos biliares, mostrando cada uno de ellos comportamientos distintos. El compuesto 4 se identificó como ácido norlitocólico, que es derivado del ácido litocólico, un ácido biliar secundario de la fermentación bacteriana conocido como agente colestásico. Este ácido biliar incremento en los animales alimentados con la DAGF, mientras que su abundancia se redujo con los tratamientos con AD.

El compuesto 5 se identificó putativamente como ácido 12-ketodesoxicólico (ácido biliar secundario), mostrando una reducción en su abundancia en los animales alimentados con la DAGF, siendo mayor esta disminución de este compuesto en el contenido cecal en los animales los que se añadió harina de AD en la DAGF. Estos resultados contrastan con los reportados por Nogacka y colaboradores (2021), quienes observaron que los individuos con obesidad tienen tres veces más ácido 12-ketodesoxicólico que los individuos con peso normal.

El compuesto 7 se identificó como 22 β -hidroxicolesterol, un derivado hidroxilado del colesterol, también conocido como oxiesterol. Estos compuestos sirven como intermediarios en el metabolismo de los ácidos biliares y se ha reportado que disminuyen la inflamación intestinal y mejorando el metabolismo del colesterol (Willinger et al., 2019). El comportamiento de este metabolito es interesante; tanto los animales de los grupos control sanos como obesos muestran una baja abundancia, pero incrementando en los grupos alimentados con grillos muestran un aumento en la abundancia de este compuesto de hasta 9 veces.

El compuesto 11 se identificó como ácido 3 β -litocólico. Curiosamente, la abundancia de este compuesto en el grupo DAGF disminuyó en comparación con la de los animales alimentados con DE. Sin embargo, al añadir harina de grillo a la DAGF, la abundancia de este ácido biliar secundario aumentó en comparación con el grupo de control obeso. Se ha reportado que este metabolito inhibe la inflamación

intestinal al suprimir la apoptosis en las células epiteliales intestinales, protegiendo así contra la pérdida de la barrera intestinal (Lajczak-McGinley et al., 2020).

Cuadro 7. Metabolitos identificados de manera putativa en contenido cecal.

Compuesto ID	Compuesto ID	Aductos	Fórmula	Score	Error de masa (ppm)	Identificación putativa *	m/z	Tiempo de retención (min)
Compuesto 1	6.45_258.0917n	M-COOH, M-H	C15H14O4	42	9.51	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propanoic acid	257.08	6.45
Compuesto 2	9.04_209.0449m/z	M+FA-H	C9H8O3	40.3	-3.87	Phenylpyruvic acid	209.04	9.03
Compuesto 3	10.61_816.5708m/z	M-COOH	C45H84NO12P	42.7	-2.74	Am-PE(P-18:0/18:2(9Z,12Z))	816.57	10.61
Compuesto 4	11.52_362.2812n	M-H2O-H, M+FA-H	C23H38O3	47.9	-2.52	(3R)-3-[(3R,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-Hydroxy-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]butanoic acid	407.28	11.52
Compuesto 5	12.20_390.2785n	M-H, 2M-H, M+FA-H	C24H38O4	36.1	3.94	12-Ketodeoxycholic acid	389.27	12.19
Compuesto 6	14.17_407.3290m/z	M-COOH	C30H44O3	42.3	-0.14	(24E)-3,11-Dioxolanosta-8,24-dien-26-al	407.32	14.17
Compuesto 7	14.81_383.3302m/z	M-H2O-H	C27H46O2	40.8	-4.44	22beta-Hydroxycholesterol	383.33	14.81
Compuesto 8	15.25_409.3441m/z	M-COOH	C30H46O3	42.9	-1.35	Moronic acid	409.34	15.24
Compuesto 9	15.99_536.3680m/z	M-COOH	C28H56NO9P	40.7	-2.14	O-([(2R)-3-(Docosanoyloxy)-2-hydroxypropoxy](hydroxy)phosphoryl)-L-serine	536.36	15.98
Compuesto 10	16.49_553.3948m/z	M-H2O-H	C35H56O6	42.3	8.55	3,16,21,28-Tetrahydroxyolean-12-en-22-yl (2Z)-2-methyl-2-butenolate	553.39	16.49
Compuesto 11	16.56_376.2978n	M-H, M+FA-H, 2M-H	C24H40O3	39.2	6.04	3b-Lithocholic acid	375.29	16.56
Compuesto 12	16.56_411.3561m/z	M-COOH	C30H48O3	52.1	-9.31	Betulinic acid	411.35	16.56
Compuesto 13	17.37_538.3833m/z	M-COOH	C28H58NO9P	38.1	-2.71	O-(Hydroxy{(2R)-2-hydroxy-3-[(2-methoxyhenicosyl)oxy]propoxy}phosphoryl)-L-serine	538.38	17.36
Compuesto 14	17.60_562.4204m/z	M-COOH	C31H62NO8P	40.9	-1.53	(2R)-3-[(2-Aminoethoxy)(hydroxy)phosphoryl]oxy)-2-(dodecanoyloxy)propyl myristate	562.42	17.60

*La identificación putativa fue realizada con el software Progenesis Q1, usando un valor de confianza mayor a 38.

Otro grupo de metabolitos identificados corresponden a los triterpenos; los compuestos 6, 8, 10 y 12 se clasificaron en esta categoría. Estos compuestos se han detectado en varias plantas y estos se encontraron en mayor abundancia en los grupos con 4 y 8 % de grillo en comparación con los animales de los controles sanos y obesos.

Se proponen dos explicaciones para este comportamiento; en primer lugar, como estos compuestos son liposolubles y, como se demostró anteriormente, la suplementación con harina de grillo en la DAGF aumenta la excreción de lípidos en las heces. Por lo tanto, estos compuestos podrían estar presentes en la dieta estándar y, al incluir AD en la dieta, podrían no ser absorbidos en el intestino delgado, encontrándose en el contenido cecal.

Otra posibilidad es que estos compuestos estén presentes en la propia harina de grillo. Reportes recientes han demostrado que los insectos comestibles son abundantes en fitosteroles y estos son obtenidos de la dieta, una situación similar podría aplicarse a los triterpenos encontrados en el contenido intestinal de los animales suplementados con harina de grillo en este estudio (Mudalungu et al., 2023). A los triterpenos y fitoesteroles se les han atribuido diversas actividades biológicas, incluidos efectos antiinflamatorios (Zhu et al., 2022).

Cuadro 8. Abundancia normalizada de metabolitos identificados en el contenido cecal de ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y fructosa (DAGF) y suplementadas con 4 y 8% de *Acheta domesticus* (AD). Los resultados indican la media \pm desviación estándar (n = 6).

Compuesto	Compuesto ID	DE	DAGF	DAGF + 4 %AD	DAGF + 8 %AD
Compuesto 1	6.45_258.0917n	303 \pm 52 c	267 \pm 35 c	876 \pm 114 b	1103 \pm 197 a
Compuesto 2	9.04_209.0449m/z	0 \pm 0 ab	0 \pm 0 b	23 \pm 9 ab	40 \pm 19 a
Compuesto 3	10.61_816.5708m/z	196838 \pm 55555 ab	80025 \pm 20650 b	91002 \pm 28063 b	98875 \pm 16554 b
Compuesto 4	11.52_362.2812n	32293 \pm 18417 b	165737 \pm 92946 a	105184 \pm 65454 ab	57378 \pm 31005 b
Compuesto 5	12.20_390.2785n	216352 \pm 69454 ab	84134 \pm 37774 b	97349 \pm 33138 b	137299 \pm 32092 b
Compuesto 6	14.17_407.3290m/z	134 \pm 39 b	179 \pm 66 b	2392 \pm 967 a	3354 \pm 2386 a
Compuesto 7	14.81_383.3302m/z	221 \pm 61 b	195 \pm 46 b	1275 \pm 329 a	1814 \pm 1097 a
Compuesto 8	15.25_409.3441m/z	167 \pm 27 b	176 \pm 49 b	1405 \pm 356 a	2058 \pm 1334 a
Compuesto 9	15.99_536.3680m/z	130 \pm 21 b	146 \pm 24 b	1066 \pm 351 a	929 \pm 418 a
Compuesto 10	16.49_553.3948m/z	80 \pm 16 b	84 \pm 25 b	524 \pm 213 a	330 \pm 136 a
Compuesto 11	16.56_376.2978n	140550 \pm 41599 a	55055 \pm 23742 b	76356 \pm 18080 b	99977 \pm 29683 ab
Compuesto 12	16.56_411.3561m/z	64 \pm 17 b	96 \pm 42 b	269 \pm 110 a	304 \pm 132 a
Compuesto 13	17.37_538.3833m/z	216 \pm 37 b	262 \pm 106 b	1309 \pm 453 a	1104 \pm 385 a
Compuesto 14	17.60_562.4204m/z	118 \pm 8 b	99 \pm 15 b	1576 \pm 618 a	1345 \pm 606 a

7.5 Efectos antiinflamatorios producidos por el consumo de *Acheta domestica* en animales alimentados con la DAGF

La inflamación sistémica es un factor crítico que influye en la dinámica de la microbiota intestinal. Existen una serie de estudios que demuestran una relación entre la inflamación sistémica y las alteraciones en la composición y función de la microbiota intestinal. Los estudios de Smith y colaboradores (2013) demostraron que la disbiosis intestinal, así como los cambios en los metabolitos microbianos producidos en un estado de obesidad puede inducir la inflamación sistémica. Esta disbiosis, caracterizada por cambios en los taxones microbianos y un desequilibrio en los metabolitos microbianos pro y antiinflamatorios, exagera aún más la inflamación sistémica, creando un bucle de retroalimentación perjudicial (Brown et al., 2012). Comprender esta intrincada interacción entre la inflamación sistémica y la microbiota intestinal es fundamental para dilucidar posibles dianas terapéuticas para disminuir la inflamación sistémica y sus implicaciones para la salud.

En este estudio se encontró que la adición de harina de grillo a la DAGF puede inducir cambios en la microbiota intestinal, y que esta harina mejoró los parámetros relacionados con la resistencia a la insulina y el metabolismo lipídico. Debido a lo anterior, en el presente estudio se investigó si la suplementación con grillos puede reducir los marcadores de inflamación sistémica en suero. Para posteriormente realizar un análisis de correlación entre las citosinas inflamatorias en suero, abundancia de la microbiota intestinal y parámetros metabólicos. Se realizó un perfil de 10 marcadores de inflamación, y los resultados se presentan en el anexo 6. Cabe destacar que, de las 10 citosinas evaluadas, sólo los niveles séricos de TNF- α , la IL-2, la IL-1 α y la IL-1 β mostraron cambios significativos en los grupos alimentados con la DAGF y suplementada con harina de grillo en comparación con los valores del control obeso (Figura 30).

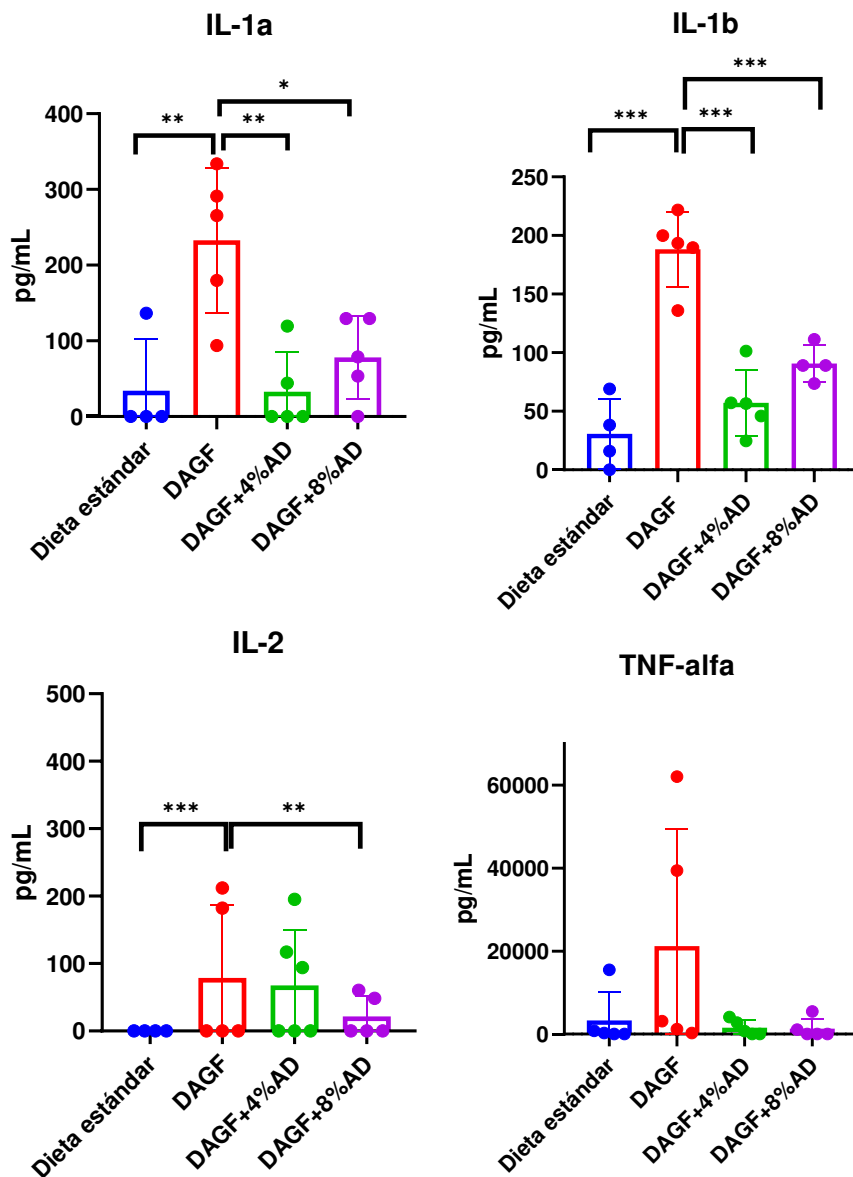


Figura 30. Perfil de citosinas inflamatorias y antiinflamatorias en suero de ratas alimentadas con una DAGF suplementada con 4 y 8 % de *Acheta domesticus*. Las barras indican media \pm desviación estándar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ mediante prueba de Kruskal-Wallis. Las barras indican la media \pm desviación estándar ($n = 5$).

Los miembros de la familia de la interleucina-1 desempeñan un papel fundamental en el contexto de la obesidad. Estas citosinas proinflamatorias son mediadores

clave de la respuesta inflamatoria y están significativamente elevados en el suero de individuos con obesidad, contribuyendo a la inflamación crónica de bajo grado asociada al tejido adiposo. La IL-1 α y la IL-1 β están implicadas en diversas complicaciones relacionadas con la obesidad, como la resistencia a la insulina, la disfunción del tejido adiposo y el síndrome metabólico (Larsen et al., 2007; Donath y Shoelson, 2011).

El TNF- α desempeña un papel crucial en la obesidad como citosina pro inflamatoria proveniente principalmente de los macrófagos residentes del tejido adiposo. Este TNF- α induce la resistencia a la insulina, además incrementa la lipólisis del tejido adiposo incrementando la síntesis de ácidos grasos libres, lo que se ve reflejado en un aumento de la síntesis hepática de glucosa. Además, TNF- α desencadena una cascada de respuestas inflamatorias al activar otras citosinas proinflamatorias como la IL-6 y la IL-1 β , exacerbando el estado inflamatorio crónico prevalente en la obesidad (Catworn et al., 2008). Al infiltrarse el TNF- α a los macrófagos M1 en el tejido adiposo, el TNF- α promueve la activación de quinasas que fosforilan los residuos de serina del IRS-1, reduciendo la captación de glucosa dependiente de la insulina en este tejido (Kojta et al., 2020).

En la Figura 30 se observa una disminución de los niveles séricos de las citosinas inflamatorias en los grupos suplementados con grillo al 4 y 8 %, los que podría atribuirse a cambios en la microbiota intestinal y conducir a una menor permeabilidad intestinal y a una menor infiltración de endotoxinas. Esto podría dar lugar a una menor inflamación sistémica mediada por TLR-4 en respuesta al LPS bacteriano, lo que podría estar relacionado con cambios en la resistencia a la insulina. No obstante, este mecanismo deberá confirmarse en futuros estudios.

Para evaluar si alguna de las familias bacterianas de la microbiota fecal, estaba correlacionada con cambios en la concentración de citosinas inflamatorias en suero se realizó un análisis de correlación de Pearson, entre las concentraciones séricas de TNF- α , la IL-2, la IL-1 α y la IL-1 β y la abundancia relativa a nivel familia de la microbiota fecal.

De los análisis de correlación se encontraron que de las citosinas que se usaron para la prueba estadística, solamente IL-1 β mostró correlaciones negativas significativas con las bacterias Rikenellaceae, *Bacteroidaceae* y *Prevotellaceae* (Figura 31).

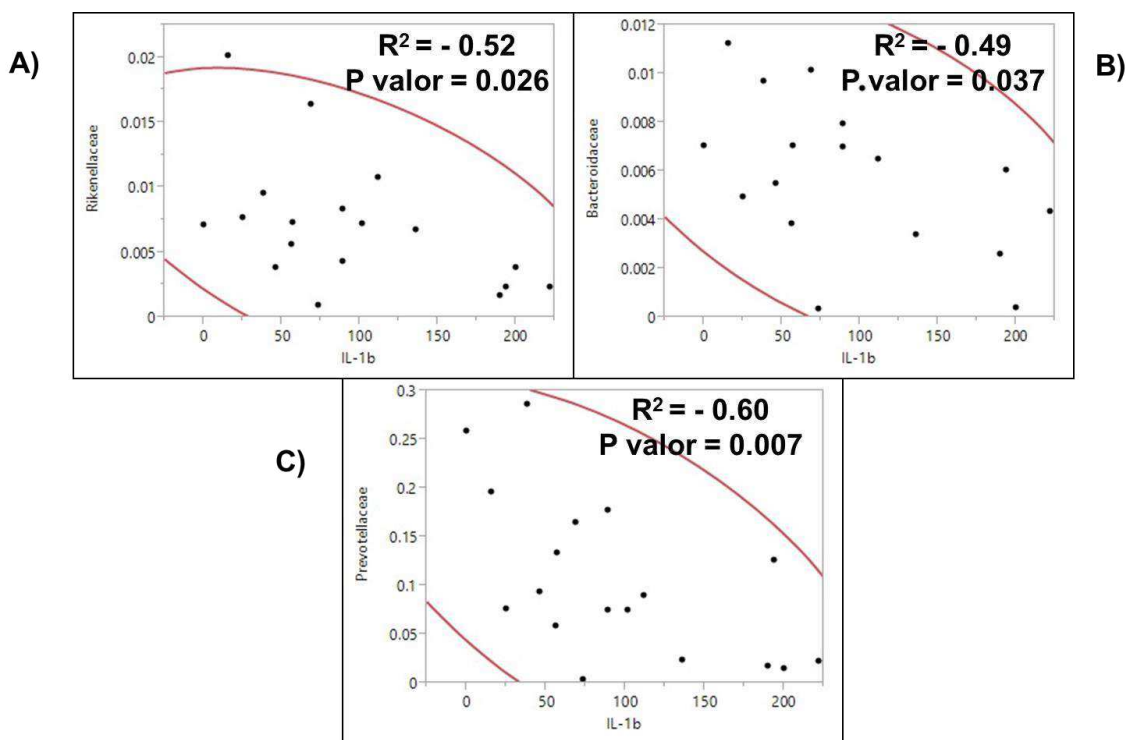


Figura 31. Análisis de correlación de Pearson entre las concentraciones séricas de IL-1 β y la abundancia relativa de las familias bacterianas Rikenellaceae A), *Bacteroidaceae* B) y *Prevotellaceae* C).

El resultado anterior indica que existe una relación donde entre más se incrementa la abundancia de familias bacterianas como *Prevotellaceae* existe una menor concentración de la citosina proinflamatoria IL-1 β .

Numerosos estudios discutidos en el presente documento han señalado que intervenciones dietéticas altas en fibra se correlacionan positivamente con la abundancia de *Prevotellaceae*, la cual su abundancia esta también relacionada con una mejora en la integridad intestinal, una menor inflamación intestinal y una menor infiltración de endotoxinas bacterianas (Balfegó et al., 2016; Song et al., 2019).

Una posible explicación del efecto que tiene la suplementación de la harina de AD en la DAGF sobre la dislipidemia y la resistencia a la insulina podría estar relacionada con la llegada de la fracción no digerible de AD al intestino grueso, siendo fermentada por la microbiota, incrementando la abundancia de bacterias benéficas como Rikenellaceae, *Bacteroidaceae* y *Prevotellaceae*, las cuales promueven un incremento en la permeabilidad intestinal, y por ende una menor endotoxemia metabólica, lo que se ve reflejado en la correlación inversa entre la IL-1 β y algunas familias bacterianas.

La disminución de la inflamación relacionada con la microbiota podría estar relacionada con una mejora en parámetros metabólicos relacionados con la obesidad. Para evaluar lo anterior se realizó un análisis de correlación entre la citosina IL-1 β y parámetros como la AUC de la OGTT, triglicéridos y glucosa sérica, así como el peso del tejido adiposo blanco y visceral, lo cual se muestra en la figura 32. En el análisis de correlación se muestra que existe una correlación positiva y significativa entre las concentraciones séricas de IL-1 β y la área bajo la curva de la OGTT, la acumulación de tejido adiposo así como en las concentraciones séricas de glucosa y triglicéridos, por lo cual sugerimos que la mejora en estos parámetros de los animales que fueron suplementados al 8 % con harina de AD en una DAGF está relacionada con una disminución en la inflamación causada por modificaciones en la microbiota intestinal

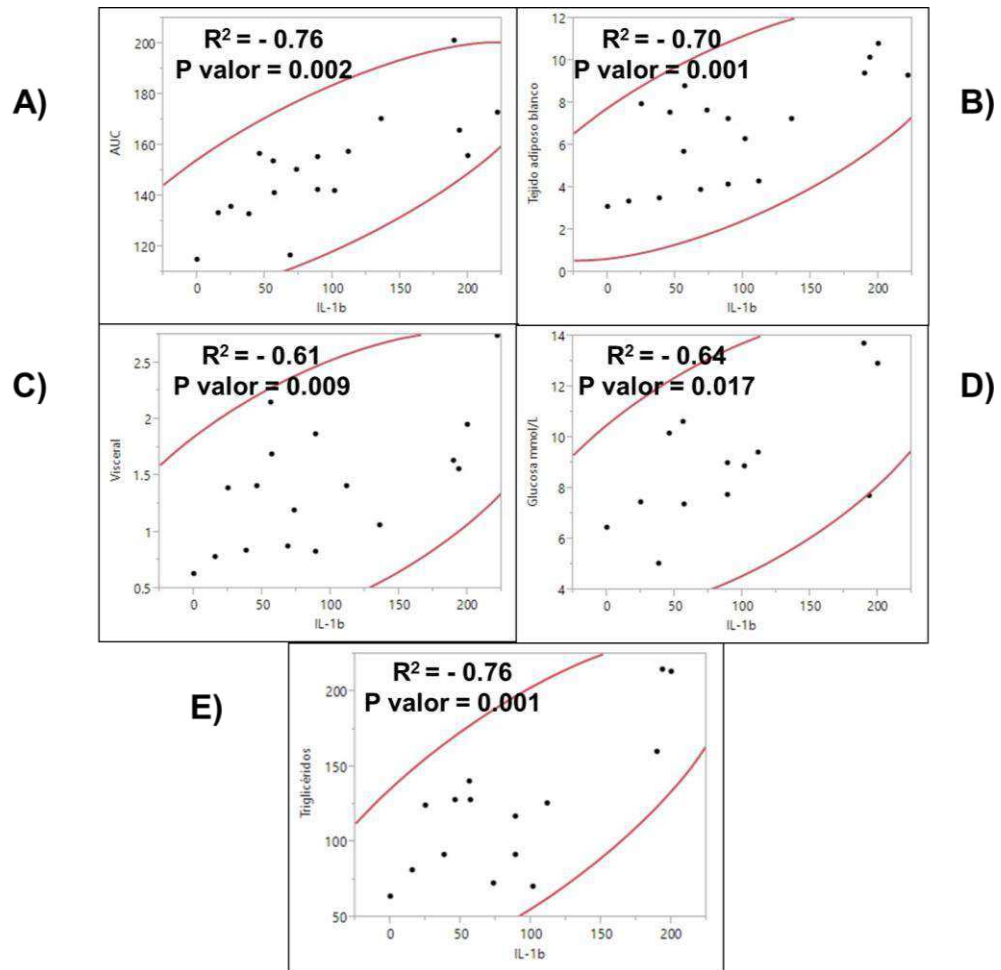


Figura 32. Análisis de correlación de Pearson entre las concentraciones séricas de IL-1 β y la como la AUC de la OGTT A), Peso del tejido adiposo blanco B), Peso del tejido adiposo visceral C), Glucosa sérica D) y Triglicéidos en suero E)

8. CONCLUSIONES

Acheta domesticus al 8 % incorporado en la DAGF previene la ganancia de peso corporal, la acumulación de tejido adiposo visceral, los triglicéridos en suero y en hígado, mejorando la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa. El efecto en los lípidos se relacionó con una mayor excreción de estos en heces, posiblemente debido a la inhibición de la enzima lipasa pancreática, lo cual se demostró *in vitro*.

Los animales que fueron suplementados con AD en la DAGF mostraron niveles mayores de diversidad microbiana, contrarrestando los cambios inducidos por la DAGF. Se observaron alteraciones en la composición taxonómica, con un aumento de *Bacteroidetes* y una disminución de *Firmicutes*, asociados con una mejor salud metabólica. El análisis del metaboloma intestinal reveló que los animales que fueron suplementados con AD al 8% en una DAGF tuvieron mayores abundancias de metabolitos bacterianos, los ácidos biliares y los triterpenos asociados con una mejora en la salud metabólica.

Además, la suplementación con AD redujo los marcadores de inflamación sistémica, como el TNF-alfa y la IL-1 β , lo que indica disminución de la inflamación lo que correlacionó con una mejora en los parámetros metabólicos asociados a la obesidad.

Estos resultados sugieren que la AD puede tener un papel terapéutico en enfermedades relacionadas con la obesidad correlacionadas con cambios en la microbiota intestinal y en la inflamación.

9- REFERENCIAS

Abdel-Daim, M. M., El-Tawil, O. S., Bungău, S., & Atanasov, A. G. (2019). Applications of antioxidants in metabolic disorders and degenerative diseases: mechanistic approach. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-3. <https://doi.org/10.1155/2019/4179676>

Adams, L. A., & Morrison, M. (2016). The microbiome in obesity, diabetes, and NALFD: What is Your Gut Telling Us? *Current Hepatology Reports*, 15(2), 96-102. <https://doi.org/10.1007/s11901-016-0299-5>

Agus, A., Denizot, J., Thévenot, J., Martínez-Medina, M., Massier, S., Sauvanet, P., Bernalier-Donadille, A., Denis, S., Hofman, P., Bonnet, R., Billard, E., & Barnich, N. (2016). Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *Escherichia coli* infection and intestinal inflammation. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep19032>

Ahn, M. Y., Hwang, J. S., & Yun, E. Y. (2015). Microarray analysis and anti-hyperglycemia effect of *Gryllus bimaculatus* (GB, a type of cricket) extract in rats on high fat diet. *The FASEB Journal*, 30(S1). https://doi.org/10.1096/fasebj.30.1_supplement.654.1

Alessandri, G., Milani, C., Duranti, S., Mancabelli, L., Ranjanoro, T., Modica, S., Carnevali, L., Statello, R., Bottacini, F., Turrone, F., Ossiprandi, M. C., Sgoifo, A., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2019). Ability of *Bifidobacteria* to metabolize chitin-glucan and its impact on the gut microbiota. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42257-z>

Al-Mansoori, L., Al-Jaber, H., Prince, M. S., & Elrayess, M. A. (2021). Role of inflammatory cytokines, growth factors and adipokines in adipogenesis and insulin resistance. *Inflammation*, *45*(1), 31-44. <https://doi.org/10.1007/s10753-021-01559-z>

Alyass, A., Almgren, P., Åkerlund, M., Dushoff, J., Isomaa, B., Nilsson, P. M., Tuomi, T., Lyssenko, V., Groop, L., & Meyre, D. (2014). Modelling of OGTT curve identifies 1 h plasma glucose level as a strong predictor of incident type 2 diabetes: results from two prospective cohorts. *Diabetologia*, *58*(1), 87-97. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3390-x>

Anstee, Q. M., Reeves, H. L., Kotsiliti, E., Govaere, O., & Heikenwälder, M. (2019). From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *16*(7), 411-428. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0145-7>

Aron-Wisnewsky, J., Prifti, E., Belda, E., Ichou, F., Kayser, B. D., Dao, M. C., Verger, E. O., Hedjazi, L., Bouillot, J., Chevallier, J., Pons, N., Levenez, F., Ehrlich, S. D., Doré, J., Zucker, J., & Clément, K. (2018). Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery. *Gut*, *68*(1), 70-82. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316103>

Ayieko, M. A., Ogola, H. J. O., & Ayieko, I. A. (2016). Introducing rearing crickets (gryllids) at household levels: adoption, processing and nutritional values. *Journal of Insects as Food and Feed*, *2*(3), 203-211. <https://doi.org/10.3920/jiff2015.0080>

Baek, M., Kim, M. A., Kwon, Y., Hwang, J., Goo, T., Jun, M., & Yun, E. (2019). Effects of processing methods on nutritional composition and antioxidant activity of

mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae. *Entomological Research*, 49(6), 284-293.
<https://doi.org/10.1111/1748-5967.12363>

Balfegó, M., Canivell, S., Hanzu, F. A., Sala-Vila, A., Martinez-Medina, M., Murillo, S., Mur, T., Ruano, E. G., Linares, F., Porras, N., Valladares, S., Fontalba, M. I., Roura, E., Novials, A., Hernández, C., Aranda, G., Sisó-Almirall, A., Rojo-Martínez, G., Simó, R., & Gomis, R. (2016). Effects of sardine-enriched diet on metabolic control, inflammation and gut microbiota in drug-naïve patients with type 2 diabetes: a pilot randomized trial. *Lipids in health and Disease*, 15(1), 78.
<https://doi.org/10.1186/s12944-016-0245-0>

Benhabiles, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M. F. A., & Mameri, N. (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 48-56.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.013>

Bergmans, R. S., Nikodémová, M., Stull, V. J., Redding, A., & Malecki, K. (2020). Comparison of cricket diet with peanut-based and milk-based diets in the recovery from protein malnutrition in mice and the impact on growth, metabolism and immune function. *PloS One*, 15(6), e0234559.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234559>

Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews. Endocrinology*, 15(5), 288-298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>

Bock, G., Chittilapilly, E., Basu, R., Toffolo, G., Cobelli, C., Chandramouli, V., Landau, B. R., & Rizza, R. A. (2007). Contribution of hepatic and extrahepatic Insulin

Resistance to the Pathogenesis of Impaired Fasting Glucose. *Diabetes*, 56(6), 1703-1711. <https://doi.org/10.2337/db06-1776>

Bonora, E., Targher, G., Alberiche, M., Bonadonna, R. C., Saggiani, F., Zenere, M., Monauni, T., & Muggeo, M. (2000). Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care*, 23(1), 57-63. <https://doi.org/10.2337/diacare.23.1.57>

Borrayo, G., Basurto, L., González-Escudero, E., Díaz, A., Vázquez, A. E., Sánchez, L., Hernández-González, G. O., Barrera, S., Degollado, J. A., Córdova, N., & Avelar, F. (2018). Tg/Hdl-C ratio as cardio-metabolic biomarker even in normal weight women. *Acta Endocrinologica*, 14(2), 261-267. <https://doi.org/10.4183/aeb.2018.261>

Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E., & Gibson, D. L. (2012). Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*, 4(8), 1095-1119. <https://doi.org/10.3390/nu4081095>

Callahan, B., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Cao, K. L., Boitard, S., & Besse, P. (2011). Sparse PLS discriminant analysis: Biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 253. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-253>

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C., McDonald, D.,

Muegge, B. D., Pirrung, M., Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335-336.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>

Chen, L., Yang, P., Hu, L., Yang, L., Chu, H., & Hou, X. (2023). Modulating phenylalanine metabolism by *Lactobacillus acidophilus* alleviates alcohol-related liver disease through enhancing intestinal barrier function. *Cell & Bioscience*, 13(1).

<https://doi.org/10.1186/s13578-023-00974-z>

Cheng, J. T. (2018). Glucose tolerance test applied in screening of anti-diabetic agent (S). *Current Research in Diabetes & Obesity Journal*, 7(4).

<https://doi.org/10.19080/crdoj.2018.07.555716>

Chusyd, D. E., Wang, D., Huffman, D. M., & Nagy, T. R. (2016). Relationships between rodent white adipose fat pads and human white adipose fat depots.

Frontiers in Nutrition, 3. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00010>

Coronado-Cáceres, L. J., Rabadán-Chávez, G., Mojica, L., Hernández-Ledesma, B., Quevedo-Corona, L., & Cervantes, E. L. (2020). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) seed proteins anti-obesity potential through lipase inhibition using *in silico*, *in vitro* and *in vivo* models. *Foods*, 9(10), 1359.

<https://doi.org/10.3390/foods9101359>

D'Antonio, V., Serafini, M., & Battista, N. (2021). Dietary modulation of oxidative stress from edible insects: a mini-review. *Frontiers in Nutrition*, 8:642551.

<https://doi.org/10.3389/fnut.2021.642551>

De Castro, R. J. S., Ohara, A., Aguilar, J. G. D. 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 & Technology*, 76, 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.006>

Del Hierro, J. N., Gutiérrez-Docio, A., Otero, P., Reglero, G., & Martín, D. (2020). Characterization, antioxidant activity, and inhibitory effect on pancreatic lipase of extracts from the edible insects *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor*. *Food Chemistry*, 309, 125742. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125742>

Del Pino-García, R., García-Lomillo, J., Rivero-Pérez, M. D., & González-SanJosé, M. L. (2015). Adaptation and validation of QUick, Easy, New, CHEap, and Reproducible (QUENCHER) antioxidant capacity assays in model products obtained from residual wine pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(31), 6922-6931. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01644>

Di Lorenzo, F., De Castro, C., Silipo, A., & Molinaro, A. (2019). Lipopolysaccharide structures of Gram-negative populations in the gut microbiota and effects on host interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(3), 257-272. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz002>

Di Mattia, C., Battista, N., Sacchetti, G., & Serafini, M. (2019). Antioxidant activities *in vitro* of Water and Liposoluble Extracts Obtained by Different Species of Edible Insects and Invertebrates. *Frontiers in Nutrition*, 6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00106>

Donath, M. Y., & Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews. Immunology*, 11(2), 98-107. <https://doi.org/10.1038/nri2925>

Escobar-Ortiz, A., Hernández-Saavedra, D., Lizardi-Mendoza, J., Pérez-Ramírez, I. F., Mora, O., Ramos-Gómez, M., & Reynoso-Camacho, R. (2022).

Consumption of cricket (*Acheta domesticus*) flour decreases insulin resistance and fat accumulation in rats fed with high-fat and -fructose diet. *Journal of Food Biochemistry*, 46(9). <https://doi.org/10.1111/jfbc.14269>

Eslam, M., Newsome, P. N., Sarin, S. K., Anstee, Q. M., Targher, G., Romero-Gómez, M., Zelber-Sagi, S., Wong, V. W., Dufour, J., Schattenberg, J. M., Kawaguchi, T., Arrese, M., Valenti, L., Shiha, G., Tiribelli, C., Yki-Järvinen, H., Fan, J. G., Grønbaek, H., Yilmaz, Y., George, J. (2020). A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *Journal of Hepatology*, 73(1), 202-209. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.039>

Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., De Vos, W. M., & Cani, P. D. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America*, 110(22), 9066-9071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110>

Færch, K., Torekov, S. S., Vistisen, D., Johansen, N. B., Witte, D. R., Jonsson, A., Pedersen, O., Hansen, T., Lauritzen, T., Sandbæk, A., & Holst, J. J. (2015). GLP-1 response to oral glucose is reduced in prediabetes, screen-detected type 2 diabetes, and obesity and influenced by sex: The ADDITION-PRO Study. *Diabetes*, 64(7), 2513-2525. <https://doi.org/10.2337/db14-1751>

García-Mantrana, I., Selma-Royo, M., Alcântara, C., & Collado, M. C. (2018). Shifts on gut microbiota associated to mediterranean diet adherence and specific

dietary intakes on general adult population. *Frontiers in Microbiology*, 9:00890.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00890>

Ghorbani, Y., Schwenger, K. J. P., & Allard, J. P. (2021). Manipulation of intestinal microbiome as potential treatment for insulin resistance and type 2 diabetes. *European Journal of Nutrition*, 60(5), 2361-2379.
<https://doi.org/10.1007/s00394-021-02520-4>

Gomes, A. L., Hoffmann, C., & Mota, J. F. (2018). The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes*, 9(4), 308-325.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1465157>

Gómez-Velázquez, H. D. J., Aparicio-Fernández, X., & Reynoso-Camacho, R. (2021). Chia sprouts elicitation with salicylic acid and hydrogen peroxide to improve their phenolic content, antioxidant capacities *in vitro* and the antioxidant status in obese rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76(3), 363-370.
<https://doi.org/10.1007/s11130-021-00912-9>

Gromski, P. S., Muhamadali, H., Ellis, D. I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M. L., & Goodacre, R. (2015). A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta*, 879, 10-23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.012>

Guan, Z., & Feng, Q. (2022). Chitosan and chitooligosaccharide: the promising non-plant-derived prebiotics with multiple biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6761.
<https://doi.org/10.3390/ijms23126761>

Gurung, M., Li, Z., You, H., Rodrigues, R. R., Jump, D. B., Morgun, A., & Shulzhenko, N. (2020). Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine*, 51, 102590. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.051>

Hall, F., Johnson, P. E., & Liceaga, A. M. (2018). Effect of enzymatic hydrolysis on bioactive properties and allergenicity of cricket (*Gryllobes sigillatus*) protein. *Food Chemistry*, 262, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.058>

Ham, J. R., Choi, R., Lee, Y., & Lee, M. (2021). Effects of edible insect *Tenebrio molitor* larva fermentation extract as a Substitute Protein on Hepatosteatogenesis and Proteomic Changes in Obese Mice Induced by High-Fat Diet. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3615. <https://doi.org/10.3390/ijms22073615>

Hammer, L., Moretti, D., Abbühl-Eng, L., Kandiah, P., Hilaj, N., Portmann, R., & Egger, L. (2023). Mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and crickets (*Acheta domesticus*) show high total protein *in vitro* digestibility and can provide good-to-excellent protein quality as determined by *in vitro* DIAAS. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1150581>

Han, F., Wu, G., Zhang, Y., Zheng, H., Han, S., Li, X., Cai, W., Liu, J., Zhang, W., Zhang, X., & Hu, D. (2020). *Streptococcus thermophilus* attenuates inflammation in septic mice mediated by gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 11(20). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.598010>

Hardy, O. T., Czech, M. P., & Corvera, S. (2012). What causes the insulin resistance underlying obesity? *Current Opinion In Endocrinology, Diabetes and*

Obesity Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity, 19(2), 81-87.
<https://doi.org/10.1097/med.0b013e3283514e13>

Harsch, I. A., & Konturek, P. C. (2018). The role of gut microbiota in obesity and type 2 and type 1 diabetes mellitus: new insights into “old” diseases. *Medical Sciences*, 6(2), 32. <https://doi.org/10.3390/medsci6020032>

He, M., & Shi, B. (2017). Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: the role of probiotics and prebiotics. *Cell & Bioscience*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0183-1>

Hehemann, J., Correc, G., Barbeyron, T., Helbert, W., Czjzek, M., & Michel, G. (2010). Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*, 464(7290), 908-912. <https://doi.org/10.1038/nature08937>

Hulmán, Á., Witte, D. R., Vistisen, D., Balkau, B., Dekker, J., Herder, C., Hatunic, M., Konrad, T. R., Færch, K., & Manco, M. (2018). Pathophysiological characteristics underlying different glucose response curves: a latent class trajectory analysis from the prospective EGIR-RISC study. *Diabetes Care*, 41(8), 1740-1748. <https://doi.org/10.2337/dc18-0279>

Hurrle, S., & Hsu, W. H. (2017). The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomedical Journal*, 40(5), 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.06.007>

Hwang, B. B., Chang, M. H., Lee, J. H., Heo, W., Kim, J. K., Pan, J. H., Kim, Y. J., & Kim, J. H. (2019). The Edible Insect *Gryllus bimaculatus* Protects against Gut-Derived Inflammatory Responses and Liver Damage in Mice after Acute Alcohol Exposure. *Nutrients*, 11(4), 857. <https://doi.org/10.3390/nu11040857>

Ibitoye, E. B., Lokman, I. H., Noor, M. H. M., Goh, Y. M., Zuki, A., & Jimoh, A. O. (2018). Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan isolated from house cricket. *Biomedical Materials*, 13(2), 025009. <https://doi.org/10.1088/1748-605x/aa9dde>

Ilhan, Z. E., DiBaise, J. K., Isern, N. G., Hoyt, D., Marcus, A. K., Kang, D. W., Crowell, M. D., Rittmann, B. E., & Krajmalnik-Brown, R. (2017). Distinctive microbiomes and metabolites linked with weight loss after gastric bypass, but not gastric banding. *The ISME Journal*, 11(9), 2047-2058. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.71>

Jagannathan, R., Neves, J. S., Dorcely, B., Chung, S. T., Tamura, K., Rhee, M. K., & Bergman, M. (2020). The Oral Glucose Tolerance Test: 100 Years Later. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 13, 3787-3805. <https://doi.org/10.2147/dms.o.s246062>

Karlsson, F., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C. J., Fagerberg, B., Nielsen, J., & Bäckhed, F. (2013). Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*, 498(7452), 99-103. <https://doi.org/10.1038/nature12198>

Kc, C., Y, L., & Jt, C. (2018). The areas under curves (AUC) used in diabetes research: Update view. *Integrative Obesity and Diabetes*, 4(3). <https://doi.org/10.15761/iod.1000212>

Kim, D., Kim, E., Chang, Y., Ahn, M., Lee, Y., Park, J. J., & Lim, J. (2016). Determination of the shelf life of cricket powder and effects of storage on its quality characteristics. *Han'gug Sigpum Jeojang Yu'tong Haghoeji/Han-guk Sikpum*

Jeojang *Yutong* *Hakoeji*, 23(2), 211-217.

<https://doi.org/10.11002/kjfp.2016.23.2.211>

Kim, D., Wang, Y., Jung, H., Field, R. L., Zhang, X., Liu, T., Ma, C., Fraser, J. S., Brestoff, J. R., & Van Dyken, S. J. (2023). A type 2 immune circuit in the stomach controls mammalian adaptation to dietary chitin. *Science*, 381(6662), 1092-1098. <https://doi.org/10.1126/science.add5649>

Kim, M., Hwang, S., Park, E. J., & Bae, J. (2013). Strict vegetarian diet improves the risk factors associated with metabolic diseases by modulating gut microbiota and reducing intestinal inflammation. *Environmental Microbiology Reports*, 5(5), 765-775. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12079>

Kochumon, S., Madhoun, A. A., Al-Rashed, F., Thomas, R., Sindhu, S., Al-Ozairi, E., Al-Mulla, F., & Ahmad, R. (2020). Elevated adipose tissue associated IL-2 expression in obesity correlates with metabolic inflammation and insulin resistance. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73347-y>

Kojta, I., Chacińska, M., & Błachnio-Zabielska, A. (2020). Obesity, bioactive lipids, and adipose tissue inflammation in insulin resistance. *Nutrients*, 12(5), 1305. <https://doi.org/10.3390/nu12051305>

Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, A., Akrami, R., Lee, Y. S., De Vadder, F., Arora, T., Hallén, A., Martens, E. C., Björck, I., & Bäckhed, F. (2015). Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella*. *Cell Metabolism*, 22(6), 971-982. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.001>

Kraus, D., Yang, Q., & Kahn, B. B. (2015). Lipid Extraction from Mouse Feces. *Bio-protocol*, 5(1), 1-4. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1375>

La Torre, Y. S., Wadea, R., Rosas, V., & Herbst, K. L. (2018). Lipedema: friend and foe. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 33(1), 20170076. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2017-0076>

Lajczak-McGinley, N. K., Porru, E., Fallon, C. M., Smyth, J. S., Curley, C. E., McCarron, P. A., Tambuwala, M. M., Roda, A., & Keely, S. J. (2020). The secondary bile acids, ursodeoxycholic acid and lithocholic acid, protect against intestinal inflammation by inhibition of epithelial apoptosis. *Physiological Reports*, 8(12), 14456. <https://doi.org/10.14814/phy2.14456>

Laroche, M., Perreault, V., Marciniak, A., Gravel, A., Chamberland, J., & Doyen, A. (2019). Comparison of conventional and sustainable lipid extraction methods for the production of oil and protein isolate from edible insect meal. *Foods*, 8(11), 572. <https://doi.org/10.3390/foods8110572>

Larsen, C. M., Faulenbach, M., Vaag, A., Vølund, A., Ehses, J. A., Seifert, B., Mandrup-Poulsen, T., & Donath, M. Y. (2007). Interleukin-1–Receptor Antagonist in Type 2 Diabetes Mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 356(15), 1517-1526. <https://doi.org/10.1056/nejmoa065213>

Lee, C. J., Sears, C. L., & Maruthur, N. M. (2019). Gut microbiome and its role in obesity and insulin resistance. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 1461(1), 37-52. <https://doi.org/10.1111/nyas.14107>

Li, X., Zhang, Y., Zhao, C., Zhang, B., Peng, B., Zhang, Y., Wang, J., & Wang, S. (2022). Positive effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) intervention on

insulin resistance and gut microbial dysbiosis induced by bisphenol A. *Journal of Functional Foods*, 93, 105083. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105083>

Lisberg, U., Myrmel, L. S., Fjære, E., Rønnevik, A. K., Bjelland, S., Fauske, K. R., Holm, J. B., Basse, A. L., Hansen, J. B., Liaset, B., Kristiansen, K., & Madsen, L. (2016). The protein source determines the potential of high protein diets to attenuate obesity development in C57BL/6J mice. *Adipocyte*, 5(2), 196-211. <https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1122855>

Liu, T., Liu, X., Chen, Q., & Shi, Y. (2020). Lipase inhibitors for obesity: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110314. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110314>

López-Santamarina, A., Del Carmen Mondragón, A., Lamas, A., Miranda, J. M., Franco, C., & Cepeda, A. (2020). Animal-origin prebiotics based on chitin: an alternative for the future? a critical review. *Foods*, 9(6), 782. <https://doi.org/10.3390/foods9060782>

Lustig, R. H., Collier, D., Kassotis, C. D., Roepke, T. A., Kim, M. J., Blanc, É., Barouki, R., Bansal, A., Cave, M. C., Chatterjee, S., Choudhury, M., Gilbertson, M., Lagadic-Gossmann, D., Howard, S., Lind, L., Tomlinson, C. R., Vondráček, J., & Heindel, J. J. (2022). Obesity I: Overview and molecular and biochemical mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, 199, 115012. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115012>

Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Poeso, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. (2020). The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients*, 12(5), 1474. <https://doi.org/10.3390/nu12051474>

Mao, X., Zhang, J., Kan, F., Gao, Y., Lan, J., Zhang, X., Hu, Z., Li, Y., & Lin, H. (2013). Antioxidant production and chitin recovery from shrimp head fermentation with *Streptococcus thermophilus*. *Food Science and Biotechnology/Food Science and Biotechnology*, *22*(4), 1023-1032. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0179-5>

Mendoza-Sánchez, M., Pérez-Ramírez, I. F., Wall-Medrano, A., Martínez-Gonzalez, A. I., Gallegos-Corona, M. A., & Reynoso-Camacho, R. (2019). Chemically induced common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) sprouts ameliorate dyslipidemia by lipid intestinal absorption inhibition. *Journal of Functional Foods*, *52*, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.032>

Mohammed, B. S., Cohen, S., Reeds, D. N., Young, V. L., & Klein, S. (2008). Long-term effects of large-volume liposuction on metabolic risk factors for coronary heart disease. *Obesity*, *16*(12), 2648-2651. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.418>

Montowska, M., Kowalczewski, P. Ł., Rybicka, I., & Fornal, E. (2019). Nutritional value, protein and peptide composition of edible cricket powders. *Food Chemistry*, *289*, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.062>

Mudalungu, C. M., Mokaya, H. O., & Tanga, C. M. (2023). Beneficial sterols in selected edible insects and their associated antibacterial activities. *Scientific Reports*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37905-4>

Narayanan, M., Shyamalagowri, S., Nithya, T. G., Aravind, J., Govarathanan, M., & Kamaraj, M. (2022). Trends and thresholds on bacterial degradation of bisphenol-A endocrine disruptor — a concise review. *Environmental Monitoring and Assessment*, *194*(12). <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10558-y>

Ndiritu, A. K., Kinyuru, J., Kenji, G. M., & Gichuhi, P. N. (2017). Extraction technique influences the physico-chemical characteristics and functional properties

of edible crickets (*Acheta domesticus*) protein concentrate. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(4), 2013-2021. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9584-4>

Neyrinck, A. M., Catry, É., Taminiau, B., Cani, P. D., Bindels, L. B., Daube, G., & Dessy, C. (2019). Chitin–glucan and pomegranate polyphenols improve endothelial dysfunction. *Scientific Reports*, 9(1), 14150. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50700-4>

Nino, M. C., Reddivari, L., Ferruzzi, M. G., & Liceaga, A. M. (2021). Targeted phenolic characterization and antioxidant bioactivity of extracts from edible *Acheta domesticus*. *Foods*, 10(10), 2295. <https://doi.org/10.3390/foods10102295>

Nogacka, A., De los Reyes-Gavilán, C. G., Martínez-Faedo, C., Ruas-Madiedo, P., Suárez, A., Mancabelli, L., Ventura, M., Cifuentes, A., León, C., Gueimonde, M., & Salazar, N. (2020). Impact of extreme obesity and diet-induced weight loss on the fecal metabolome and gut microbiota. *Molecular Nutrition & Food Research*, 65(5). <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000030>

Oonincx, D., Laurent, S., Veenenbos, M., & Van Loon, J. J. A. (2019). Dietary enrichment of edible insects with omega 3 fatty acids. *Insect Science*, 27(3), 500-509. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12669>

Pantoja-Torres, B., Toro-Huamanchumo, C. J., Urrunaga-Pastor, D., Guarnizo-Poma, M., Lázaro-Alcántara, H., Paico-Palacios, S., Del Carmen Ranilla-Seguin, V., & Benites-Zapata, V. A. (2019). High triglycerides to HDL-cholesterol ratio is associated with insulin resistance in normal-weight healthy adults. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 13(1), 382-388. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.006>

Park, S., Lee, G., Lee, H. Y., Hoang, T., & Chae, H. (2019). Glucose-lowering effect of *Gryllus bimaculatus* powder on streptozotocin-induced diabetes through the AKT/mTOR pathway. *Food Science & Nutrition*, 8(1), 402-409. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1323>

Pauliuc, D., Dranca, F., & Oroian, M. (2020). Antioxidant activity, total phenolic content, individual phenolics and physicochemical parameters suitability for romanian honey authentication. *Foods*, 9(3), 306. <https://doi.org/10.3390/foods9030306>

Pellegrini, N., Vitaglione, P., Granato, D., & Fogliano, V. (2019). Twenty-five years of total antioxidant capacity measurement of foods and biological fluids: merits and limitations. *Journal of the Science of Food and agriculture* 100(14), 5064-5078. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9550>

Pichette, J., Fynn-Sackey, N., & Gagnon, J. (2017). Hydrogen sulfide and sulfate prebiotic stimulates the secretion of glp-1 and improves glycemia in male mice. *Endocrinology*, 158(10), 3416-3425. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00391>

Pilco-Romero, G., Chisaguano-Tonato, A. M., Herrera-Fontana, M., Chimbo-Gándara, L. F., Sharifi-Rad, M., Giampieri, F., Battino, M., Leoro, M. G. V., & Álvarez-Suárez, J. M. (2023). House cricket (*Acheta domesticus*): A review based on its nutritional composition, quality, and potential uses in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 142, 104226. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104226>

Pinart, M., Dötsch, A., Schlicht, K., Laudes, M., Bouwman, J., Forslund, K., Pischon, T., & Nimptsch, K. (2021). Gut microbiome composition in obese and non-

obese persons: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, 14(1), 12. <https://doi.org/10.3390/nu14010012>

Prasun, P., Ginevic, I., & Oishi, K. (2021). Mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease and alcohol related liver disease. *Translational Gastroenterology And Hepatology*, 6, 4. <https://doi.org/10.21037/tgh-20-125>

Ribeiro, J. C., Lima, R. C., Maia, M. R., Almeida, A., Fonseca, A. J., Cabrita, A. R. J., & Cunha, L. M. (2019). Impact of defatting freeze-dried edible crickets (*Acheta domesticus* and *Gryllodes sigillatus*) on the nutritive value, overall liking and sensory profile of cereal bars. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie/Food Science & Technology*, 113, 108335. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108335>

Ritvanen, T., Pastell, H., Welling, A., & Raatikainen, M. (2020). The nitrogen-to-protein conversion factor of two cricket species - *Acheta domesticus* and *Gryllus bimaculatus*. *Agricultural and Food Science*, 29(1), 1-5. <https://doi.org/10.23986/afsci.89101>

Rivero-Pino, F., Ververis, E., Pérez-Gálvez, R., & Naska, A. (2024). Biological properties and safety aspects of edible insects. *Insects as Food and Food Ingredients*. 2024, 173-190. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-95594-2.00006-9>

Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. (2017). *Proteobacteria*: A Common Factor in Human Diseases. *BioMed Research International*, 2017, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>

Rosas-Campos, R., Meza-Ríos, A., Rodríguez-Sanabria, J. S., De la Rosa-Bibiano, R., Corona-Cervantes, K., García-Mena, J., Santos, A., Sandoval-Rodríguez, A., & Armendáriz-Borunda, J. (2022). Dietary supplementation with

mexican foods, *Opuntia ficus indica*, *Theobroma cacao*, and *Acheta domesticus*: improving obesogenic and microbiota features in obese mice. *Frontiers in Nutrition*, 2022(9), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.987222>

Rosqvist, F., Iggman, D., Kullberg, J., Cedernaes, J., Johansson, H., Larsson, A., Johansson, L., Åhlström, H., Arner, P., Dahlman, I., & Risérus, U. (2014). overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans. *Diabetes*, 63(7), 2356-2368. <https://doi.org/10.2337/db13-1622>

Ruad, A., Esquivel-Elizondo, S., De la Cuesta-Zuluaga, J., Waters, J. L., Angenent, L. T., Youngblut, N. D., & Ley, R. E. (2020). Syntrophy via interspecies H₂ transfer between *Christensenella* and *Methanobrevibacter* underlies their global cooccurrence in the human Gut. *MBio*, 11(1). <https://doi.org/10.1128/mbio.03235-19>

Sakurai, Y., Kubota, N., Yamauchi, T., & Kadowaki, T. (2021). Role of insulin resistance in MAFLD. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4156. <https://doi.org/10.3390/ijms22084156>

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *GenomeBiology.com*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>

Sharma, R., Kataria, A., Sharma, S., & Singh, B. (2021). Structural characterisation, biological activities and pharmacological potential of glycosaminoglycans and oligosaccharides: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(1), 4-15. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15379>

Siddiqui, S. A., Zhao, T., Fitriani, A., Rahmadhia, S. N., Alirezalu, K., & Fernando, I. (2024). *Acheta domesticus* (house cricket) as human foods - An

approval of the European Commission - A systematic review. *Food Frontiers*.
<https://doi.org/10.1002/fft2.358>

Singh, B., & Saxena, A. (2010). Surrogate markers of insulin resistance: A review. *World Journal of Diabetes*, 1(2), 36. <https://doi.org/10.4239/wjd.v1.i2.36>

Singh, Y., Cullere, M., Kovitvadhi, A., Chundang, P., & Zotte, A. D. (2020). Effect of different killing methods on physicochemical traits, nutritional characteristics, in vitro human digestibility and oxidative stability during storage of the house cricket (*Acheta domesticus* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies/Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 65, 102444. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102444>

Sinosaki, N. B. M., Da Silva Dos Santos, P. D., Galuch, M. B., Da Silveira, R., Bonafé, E. G., Visentainer, J. V., & De Oliveira Santos, O. (2019). Analytical method of direct derivatization of fatty acids in seeds. *Chemical Papers/Chemické Zvesti*, 73(10), 2399-2407. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00787-w>

Sipponen, M. H., Mäkinen, O. E., Rommi, K., Heiniö, R., Holopainen-Mantila, U., Hokkanen, S., Hakala, T., & Nordlund, E. (2017). Biochemical and sensory characteristics of the cricket and mealworm fractions from supercritical carbon dioxide extraction and air classification. *European Food Research & Technology*, 244(1), 19-29. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2931-1>

Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N. S., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N., & Garrett, W. S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic T reg cell homeostasis. *Science*, 341(6145), 569-573. <https://doi.org/10.1126/science.1241165>

Song, J. S., Kim, J. o. R., Yoon, S. M., Kwon, M., & Ki, C. (2023). The association between gut microbiome and hypertension varies according to enterotypes: a Korean study. *Frontiers in Microbiomes*, 2. <https://doi.org/10.3389/frmbi.2023.1072059>

Song, X., Liu, Z., Lyu, N., Liu, F., Li, B., Hao, Y., Xue, Y., Li, J., Feng, Y., Ma, Y., Hu, Y., & Zhu, B. (2019). Inulin can alleviate metabolism disorders in ob/ob mice by partially restoring leptin-related pathways mediated by gut microbiota. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics/Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 17(1), 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2019.03.001>

Spirlandeli, A., Deminice, R., & Jordao, A. (2013). Plasma Malondialdehyde as biomarker of lipid peroxidation: Effects of Acute Exercise. *International Journal ff Sports Medicine*, 35(01), 14-18. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1345132>

Stanislawski, M. A., Dabelea, D., Lange, L. A., Wagner, B. D., & Lozupone, C. A. (2019). Gut microbiota phenotypes of obesity. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0091-8>

Stull, V. J., Finer, E., Bergmans, R. S., Febvre, H. P., Longhurst, C. A., Manter, D. K., Patz, J. A., & Weir, T. L. (2018). Impact of edible cricket consumption on gut microbiota in healthy adults, a double-blind, randomized crossover trial. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29032-2>

Tang, D., Wang, Y., Kang, W., Zhou, J., Dong, R., & Feng, Q. (2020). Chitosan attenuates obesity by modifying the intestinal microbiota and increasing serum leptin levels in mice. *Journal Of Functional Foods*, 64, 103659. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103659>

Tao, W., Sun, W., Liu, L., Wang, G., Zhang, X., Pei, X., & Wang, M. (2019). Chitosan oligosaccharide attenuates nonalcoholic fatty liver disease Induced by High Fat Diet through reducing lipid accumulation, inflammation and oxidative stress in C57BL/6 Mice. *Marine drugs*, 17(11), 645. <https://doi.org/10.3390/md17110645>

Tchkonia, T., Thomou, T., Zhu, Y., Καργιαννίδης, I., Pothoulakis, C., Jensen, M. D., & Kirkland, J. L. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metabolism*, 17(5), 644-656. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.008>

Tzompa-Sosa, D. A., & Fogliano, V. (2017). Potential of Insect-Derived Ingredients for Food Applications. En *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/67318>

Tzompa-Sosa, D. A., Yi, L., Van Valenberg, H., Van Boekel, M., & Lakemond, C. (2014). Insect lipid profile: aqueous versus organic solvent-based extraction methods. *Food Research International*, 62, 1087-1094. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.052>

Udomsil, N., Imsoonthornruksa, S., Gosalawit, C., & Ketudat-Cairns, M. (2019). Nutritional values and functional properties of house cricket (*Acheta domesticus*) and field cricket (*Gryllus bimaculatus*). *Food Science and Technology Research*, 25(4), 597-605. <https://doi.org/10.3136/fstr.25.597>

Urbina, J. A., Marín, C., Rodrigo, D., & González-Tejedor, G. A. (2023). Identification of common cricket (*Acheta domesticus*) proteins, extracted by acid and alkaline methods. *Food Science and Technology International*. <https://doi.org/10.1177/10820132231208085>

Van Huis, A. (2020). Edible crickets, but which species? *Journal Of Insects As Food And Feed*, 6(2), 91-94. <https://doi.org/10.3920/jiff2020.x001>

Wajchenberg, B. L., Giannella-Neto, D., Da Silva, M. E. R., & Santos, R. F. (2002). Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Hormone and metabolic research*, *34*(11/12), 616-621. <https://doi.org/10.1055/s-2002-38256>

Wang, H., Kirkland, J. L., & Hollenberg, C. H. (1989). Varying capacities for replication of rat adipocyte precursor clones and adipose tissue growth. *The Journal of Clinical Investigation*, *83*(5), 1741-1746. <https://doi.org/10.1172/jci114075>

Weir, G. C., & Bonner-Weir, S. (2004). Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *diabetes*, *53*(suppl_3), S16-S21. https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.s16

Willinger, T. (2019). Oxysterols in intestinal immunity and inflammation. *Journal Of Internal Medicine*, *285*(4), 367-380. <https://doi.org/10.1111/joim.12855>

Wu, H., & Ballantyne, C. M. (2020). Metabolic inflammation and insulin resistance in obesity. *Circulation Research*, *126*(11), 1549-1564. <https://doi.org/10.1161/circresaha.119.315896>

Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, *64*(1), 73-84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>

Yu, M., Wang, Y., Tingfu, J., & Lv, Z. (2014). Effects of sulfate chitosan derivatives on nonalcoholic fatty liver disease. *Journal Of Ocean University Of China*, *13*(3), 531-537. <https://doi.org/10.1007/s11802-014-2511-y>

Zafar, A., Shaheen, M. R., Tahir, A. B., Da Silva, A. P. G., Manzoor, H. Y., & Zia, S. (2023). Unraveling the nutritional, biofunctional, and sustainable food

application of edible crickets: A comprehensive review. *Trends In Food Science & Technology*, 143, 104254. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104254>

Zhang, C., Li, L., Zhang, Y., & Zeng, C. (2020). Recent advances in fructose intake and risk of hyperuricemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110795. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110795>

Zhang, F., Hao, G., Shao, M., Nham, K., An, Y., Wang, Q. A., Zhu, Y., Kusminski, C. M., Hassan, G., Gupta, R. K., Zhai, Q., Sun, X., Scherer, P. E., & Öz, O. K. (2018). An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell Metabolism*, 27(1), 252-262.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.004>

Zhang, N., Peng, Y., Zhao, L., He, P., Zhu, J., Liu, Y., Liu, X., Liu, X., Deng, G., Zhang, Z., & Feng, M. (2022). Integrated analysis of gut microbiome and lipid metabolism in mice infected with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Metabolites*, 12(10), 892. <https://doi.org/10.3390/metabo12100892>

Zhang, X., Zhao, Y., Xu, J., Xue, Z., Zhang, M., Pang, X., Zhang, X., & Zhao, L. (2015). Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep14405>

Zhang, X., Zhao, Y., Zhang, M., Pang, X., Xu, J., Kang, C., Li, M., Zhang, C., Zhang, Z., Zhang, Y., Li, X., Ning, G., & Zhao, L. (2012). Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats. *PloS One*, 7(8), e42529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042529>

Zheng, J., Chen, G., Li, Q., Jiao, S., Feng, C., Zhao, X., Yin, H., Du, Y., & Liu, H. (2018). Chitin Oligosaccharide modulates gut microbiota and attenuates high-fat-diet-induced metabolic syndrome in mice. *Marine Drugs*, 16(2), 66. <https://doi.org/10.3390/md16020066>

Zhou, J., Xiong, X., Wang, K., Zou, L., Ji, P., & Yin, Y. (2018). Ethanolamine enhances intestinal functions by altering gut microbiome and mucosal anti-stress capacity in weaned rats. *British Journal Of Nutrition*, 120(3), 241-249. <https://doi.org/10.1017/s0007114518001101>

Zhu, L., Luo, C., Ma, C., Kong, L., Huang, Y., Yang, W., Huang, C., Jiang, W., & Yi, J. (2022). Inhibition of the NF- κ B pathway and ERK-mediated mitochondrial apoptotic pathway takes part in the mitigative effect of betulinic acid on inflammation and oxidative stress in cyclophosphamide-triggered renal damage of mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 246, 114150. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114150>

Zielińska, E., Karaś, M., & Baraniak, B. (2018). Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie/Food Science & Technology*, 91, 168-174. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.058>

Zsálíg, D., Berta, A., Tóth, V., Szabó, Z., Simon, K., Figler, M., Pusztafalvi, H., & Polyák, É. (2023). A Review of the Relationship between Gut Microbiome and Obesity. *Applied Sciences*, 13(1), 610. <https://doi.org/10.3390/app13010610>

Anexo 1: Dictamen de aprobación del protocolo de investigación por el comité de bioética de la facultad de química.

C.U., Querétaro, 31 de agosto de 2020
No. de oficio. CBQ20/100

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Facultad de Química
Presente

At'n. Alejandro Escobar Ortiz

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado **“Efecto de la dieta en el contenido nutricional y de compuestos bioactivos de grillo (*Acheta domesticus*) y evaluación *in vivo* de sus fracciones en enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad”**, del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **aprobado**.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.



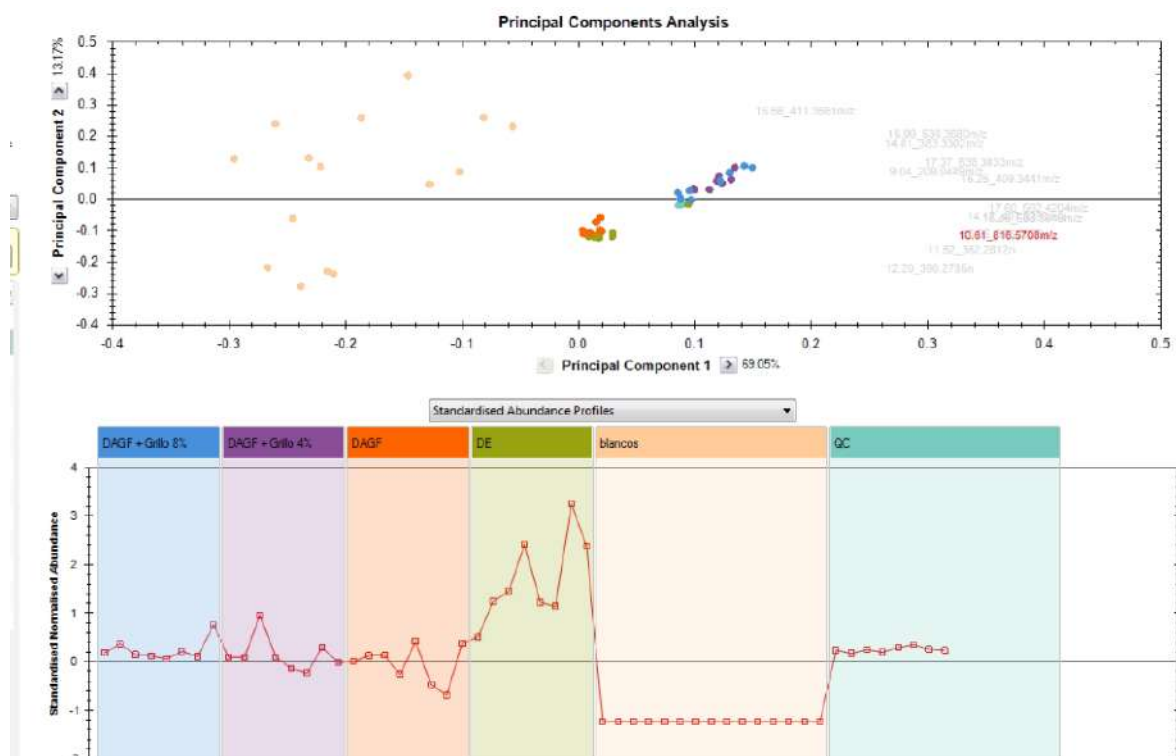
M.I.M. David Gustavo García Gutiérrez
Representante investigador



M. C. Eduardo Balderas Martínez
Representante investigador

Ccp archivo

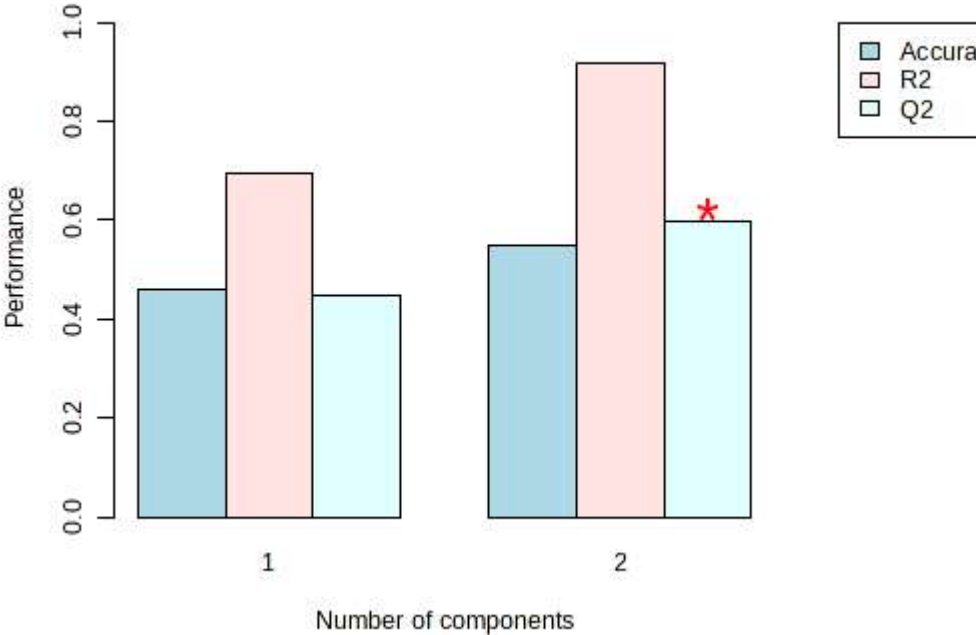
Anexo 2: Análisis multivariado donde se muestra la distribución de los datos del análisis de metabolómica, los blancos y los controles de calidad (QC).



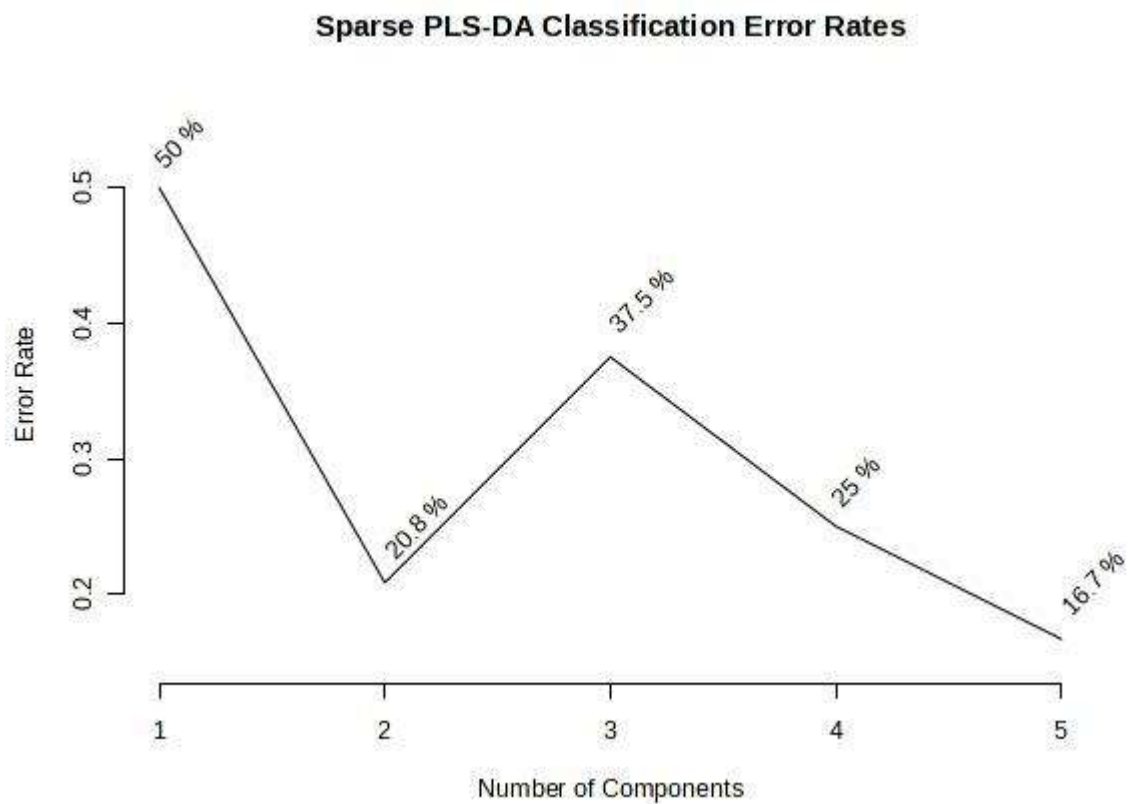
Anexo 3: Porcentaje de identificación y picos mayoritarios de identificación putativa de metabolitos de bajo peso molecular de extracto en metanol de harina de AD.

Naturaleza del compuesto	Identificación putativa	RT (min)	Porcentaje de identificación	Picos mayoritarios (m/z)
Aminoácidos	L-leucina	5.22		
	L-valina	6.1		
	L-serina	8.8		
	Treonina	9.3		
	Cistationina	9.6		
	Prolina	11.9		
	Fenilalanina	13.8		
Carbohidratos	Galactopiranosido	10.1		
	Glucopiranosido	10.9		
Ácidos orgánicos	Ácido fosfórico	5.86		299 999 73 352 300 239 314 157 301 133
	Ácido glucónico	20.6		
Ácidos grasos	Ácido cáprico	10.4		
Otros	Pirimidina	8.35		

Anexo 4: Validación cruzada del análisis PLS-DA de los metabolitos cecales.



Anexo 5: Porcentaje de error en clasificación del análisis sPLS-DA en función del número de componentes.



Anexo 6: Citosinas en suero de ratas alimentadas con una DAGF y AD

