

RESULTADOS PRELIMINARES DEL ESTUDIO DE LOS LIPIDOS DEL CUERPO GRASO Y DE LA HEMOLINFA EN INSECTOS

EDUARDO N. BOTTO (*)

SUMMARY

Knowledge of lipids metabolism in insects, might give a better base to understand nutritional studies.

Fat body and haemolymph lipids of *Diatraea saccharalis* (F.), were studied, and some preliminary results are presented here.

Experiments were conducted with *D. saccharalis* larvae (instar), reared in the Insectario de Investigaciones para Lucha Biológica INTA, Castelar, laboratories. Larvas fed on *Zea mays* stalks (natural food in these zone), were grown, under the following laboratory conditions; T: $24 \pm 2^\circ$ C; Hr: 60-65 %; Fotoperiod: LD: 16:8 horas.

Characterization of each lipid fraction were made by differential thin layer chromatography. Lipids found in these study were:

1 — Fat Body:

- a) Neutral lipids: triglycerides, diglycerides, free fatty acids, cholesterol and cholesterol esters (according with its relative abundance).
- b) Phospholipids: Sphingomyelin (0,25 Umol P); phosphatidylcholine (0,625 Umol P); phosphatidylethanolamine; cardiolipin. (0,96 Umol P).

2 — Haemolymph:

- a) Neutral lipids: monoglycerides (lacking in fat body), diglycerides, triglycerides, free fatty acids, cholesterol, and two cholesterol esters with different Rf.
- b) Phospholipids: Phosphatidyl ethanolamine (0,20 Umol P); phosphatidylcholine (0,70 Umol P); phosphatidylserine (0,50 Umol P); sphingomyelin; cardiolipin was not detected.

Some unidentified phospholipids with a Rf larger than cardiolipin were found in fat body and haemolymph.

INTRODUCCION

La posibilidad de obtener dietas artificiales para la cría de insectos significó un gran adelanto para el desarrollo de la entomología aplicada, especialmente en lo que concierne a fisiología, genética, microbiología, etc.

*) Lic. en Ciencias Biológicas, Investigador del CICA, Insectario de Investigaciones para Lucha Biológica.

Los requerimientos nutricionales en insectos, como en cualquier otro ser vivo, responden a patrones bioquímicos específicos, fuera de los cuales, muchos de los procesos vitales no se desarrollan. Esto trae como consecuencia anormalidades metabólicas y morfológicas. El conocimiento de algunas de esas características bioquímicas podría dar una mejor base de interpretación para los estudios de nutrición en insectos.

Es conocida la importancia que poseen los lípidos como fuente de energía para muchos de los procesos fisiológicos vitales en los organismos vivos. En los insectos, la reproducción, el comportamiento sexual, la morfogénesis, etc., están ligados al metabolismo de los lípidos, de allí que el estudio de los mismos haya sido considerado de importancia. La composición lipídica, suele presentar una gran variación en los diferentes órdenes de insectos y aún dentro de una misma familia, debido fundamentalmente a su modo de vida y a las características del habitat que ocupan.

En la última década, mucho se ha avanzado en el estudio de los lípidos en insectos; una importante revisión del tema puede ser consultada en Gilbert, 1967.

Los resultados que se dan a conocer en este trabajo, si bien son preliminares, suministran datos de interés biológico no conocidos hasta el presente para las especies estudiadas.

MATERIALES Y METODOS

Los estudios se efectuaron con larvas del V estadio de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera Pyralidae). Se utilizó este insecto por ser una importante plaga de varios cultivos de interés económico para la Argentina, (caña de azúcar, maíz, sorgo granífero, etc.).

Las larvas fueron criadas en las cámaras del Insectario de Investigaciones para Lucha Biológica del INTA, Castelar, sobre plantines de maíz, bajo las siguientes condiciones ambientales: Temp. $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; Humedad relativa 60-65 %; Fotoperíodo largo L:D: 16:8 horas, continuo.

El fotoperíodo fue logrado con un equipo de luces constituido por seis (6) tubos de luz fluorescente de 40 W (luz día), tres (3) lámparas incandescentes de 40 W cada una y una lámpara de vapor de mercurio de 250 W.

Para el estudio de los lípidos se emplearon el cuerpo graso y la hemolinfa de las larvas.

El estudio bioquímico de los lípidos analizados se efectuó en el laboratorio de Esteroides del Instituto de Biología y Medicina Experimental.

I — Obtención del cuerpo graso

Se lo obtuvo de la cavidad abdominal, por disección de las larvas. La extracción se realizó en frío, utilizando como solución buffer TRIS DTT, pH 6,9. Previamente a su utilización, el cuerpo graso fue secado cuidadosamente con papel de filtro y pesado. Cuando su uso no fue inmediato, se lo conservó a -30°C .

a) Obtención de la fracción lipídica:

Una masa, de aproximadamente 10-200 mg, constituida por los cuerpos grasos, se homogeneizó en cloroformo-metanol 2:1, de acuerdo con la técnica descripta por Folch *et al*, 1957. La fracción lipídica así obtenida, se llevó a sequedad bajo una corriente de N₂ para su posterior cromatografía.

b) Análisis cromatográfico:

Los lípidos neutros y los fosfolípidos fueron separados por cromatografía en placa delgada, en silicagel F 254 de 100 μ de espesor, utilizando dos sistemas de solvente de desarrollo diferencial: 1) éter de petróleo (*): 80; éter etílico: 20; ácido acético: 1, para separar los lípidos neutros (los fosfolípidos quedan en el origen de la siembra) y, 2) cloroformo: 65; metanol: 25, agua: 4, para el desarrollo cromatográfico de los fosfolípidos.

Como reveladores cromatográficos de los lípidos neutros se utilizaron vapores de I₂, ácido fosfomolibdico y una solución (aq) de acetato de cobre 3 % en ácido fosfórico 8 % (Fewster *et al*, 1969). Este último revelador permite la cuantificación por densitometría, previo calentamiento de la placa a 80°C. Los lípidos totales se cuantificaron, adaptando la técnica de Bragdon (1951), para un tamaño de muestra más pequeña (aproximadamente 10/ μ g) que las permitidas por la técnica original (aplicada para el estudio de los lípidos del plasma sanguíneo).

Los fosfolípidos fueron revelados con vapores de yodo o ninhidrinacetona (esta última permite ver la presencia de grupos NH₂).

Para la cuantificación de fósforo en las fracciones fosfolípidas, las muestras fueron digeridas con ácido perclórico y procesadas según el método de Bartlett (1959).

Para la cuantificación de las distintas fracciones lipídicas fueron corridos los siguientes patrones de referencia; ácido palmítico; colesterol; diglicéridos y triglicéridos, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, etanolamina, lisofosfátidos, cardiolipina, esfingomielina, y fosfatidiletanolamina.

II — Obtención de hemolinfa

La hemolinfa se obtuvo por punción de los segmentos abdominales de las larvas (línea media dorsal), procurando no perforar el tubo digestivo y evitando la contaminación de la muestra con lípidos del cuerpo graso. La extracción se realizó rápidamente en frío para no permitir la acción de la tiroxinas, enzima que produce el oscurecimiento de la hemolinfa. Este problema se resolvió agregando algunos cristales de feniltiourea (Wlodawer *et al*, 1966), o bien con el agregado de ácido ascórbico a la hemolinfa.

- a) Para la obtención de la fracción lipídica, se empleó la misma metodología que para el cuerpo graso, utilizándose muestras de 25 μ l. a 100 μ l,

(*) Eter de petróleo P. E. (40-80°C).

- b) Para el análisis cromatográfico se aplicó la técnica descrita anteriormente para el análisis de los lípidos del cuerpo graso.

RESULTADOS:

La metodología empleada, permitió separar sin inconvenientes los distintos constituyentes de las fracciones lipídicas, tanto del cuerpo graso como de la hemolinfa, no sólo en larvas de *D. saccharalis*, sino también en otra especie ocasionalmente estudiada, el "bicho de cesto" *Oeceticus platensis* (Berg).

I — *Cuerpo graso*:

a) **Lípidos neutros:**

Se obtuvieron las siguientes fracciones: triglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol y ésteres del colesterol. Los más abundantes, de acuerdo con la intensidad y el tamaño de las manchas obtenidas en la cromatografía, fueron en orden de importancia: triglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol y ésteres del colesterol. No se observaron monoglicéridos.

b) **Fosfolípidos:**

Estuvieron representados por: esfingomiolina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, cardiolipina y otros no identificados.

Cada una de estas fracciones se identificó, por comparación, con las cromatografías obtenidas con patrones de dichos fosfolípidos.

La cuantificación del fósforo presente en los distintos fosfolípidos (Promedio de tres muestras), registró los siguientes valores: fosfatidilcolina: 0,625 $\mu\text{mol P}$; cardiolipina: 0,96 $\mu\text{mol P}$; y esfingomiolina: 0,25 $\mu\text{mol P}$.

La figura N° 1 muestra los lípidos neutros y los fosfolípidos del cuerpo graso de *D. saccharalis* y, como dato ilustrativo, los lípidos hallados en el cuerpo graso de *Oeceticus platensis*.

II — *Hemolinfa*:

a) **Lípidos neutros:**

La cromatografía no reveló grandes diferencias respecto de lo observado en el cuerpo graso, excepto las siguientes: 1) Se detectó, próximo al origen (lugar de siembra) de la cromatografía, la presencia de monoglicéridos; 2) se detectaron dos ésteres del colesterol de distinto R_f ; 3) habría una mayor proporción de ácidos grasos libres y diglicéridos.

Al determinarse la cantidad de lípidos totales en la hemolinfa, se registró un valor aproximado de 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

b) **Fosfolípidos:**

El panorama fue similar al observado en el cuerpo graso, excepto que: 1) no se observó la fracción que corresponde, posiblemente, a la cardiolipina;

2) se observaron algunas fracciones, con un Rf mayor que el de esta última, que no pudieron ser identificadas.

La cantidad de fósforo observada en las distintas fracciones fue de: 0,20 Umol P para la fosfatidiltanolamina; 0,70 Umol P para la fosfatidilcolina y 0,50 Umol P para la fosfatidilserina.

La figura N° 2 muestra las cromatografías obtenidas para lípidos neutros y fosfolípidos hallados en la hemolinfa de *D. saccharalis* y, como dato ilustrativo, lo observado en *Oeceticus platensis*.

En el Cuadro N° 1 se comparan los lípidos del cuerpo graso y la hemolinfa de *D. saccharalis*.

CUADRO N° 1

Cuadro comparativo de los Lípidos neutros y Fosfolípidos del Cuerpo Graso y Hemolinfa de *Diatraea saccharalis* (Larvas de V estadio).

Tejidos	Lípidos	Lípidos Neutros	Fosfolípidos
Cuerpo graso		Diglicéridos (DGL) Triglicéridos (TGL) Ácidos grasos libres (AGL) Colesterol (Ch) Esteres del colesterol (ECH)	Esfingomielina (EM) 0,25 Umol P Fosfatidilserina (FS) Fosfatidilcolina (FDC) 0,625 Um P Fosfatidiletanoamina (FEA) Cardiolipina (CDL) 0,96 Umol P y de otros de > Rf??
Hemolinfa		Monoglicéridos (MGL) Diglicéridos (DGL) Triglicéridos (TGL) Ácidos grasos libres (AGL) Colesterol (Ch) (*) Esteres del colesterol (Ech)	Esfingomielina (EM) Fosfatidilserina (FS) 0,50 Umol P Fosfatidilcolina (FDC) 0,70 Um P Fosfatidiletanolamina (FEA) 0,20 Umol P y otros de > Rf??

(*) Dos tipos ≠ al menos.

DISCUSION

Si bien estos resultados son preliminares, ya que es necesaria una confirmación bioquímica más rigurosa, especialmente en el aspecto cuantitativo, se puede decir que se presentó un panorama lipídico semejante tanto en el cuerpo graso, como en la hemolinfa de *Diatraea saccharalis*.

—En el *cuerpo graso*, los triglicéridos (TGL) constituyeron la fracción más importante como era de esperarse, por ser éste un órgano de reserva de lípidos.

Los diglicéridos (DGL) y los ácidos grasos libres (AGL), le siguieron en abundancia, no hallándose, en ninguna de los casos analizados, la fracción correspondiente a los monoglicéridos (MGL).

Estos resultados, no se alejan demasiado de lo observado en otros insectos: *Hyalophora cecropia* (Gilbert, 1967), *Oncopeltus fasciatus* (Thomas, 1974) y *Pyrrhocoris apterus* (Martin, 1969 a).

—Los lípidos estudiados en la *hemolinfa*, fueron similares a los del cuerpo graso excepto que, en la primera, fue posible detectar monoglicéridos (MGL) cercanos al origen de siembra. Los ácidos grasos libres (AGL) y los diglicéridos (DGL) serían aparentemente más abundantes aquí, que en el cuerpo graso.

Respecto de los fosfolípidos, sí se hallaron diferencias cualitativas y cuantitativas entre el cuerpo graso y la hemolinfa. Por ejemplo, la cardiolipina (CDL), ausente (o presente en muy bajos niveles) en la hemolinfa, resultó ser el fosfolípido más importante en el cuerpo graso (0,96 Umol P).

La fosfatidilcolina (FDC) en cambio, con 0,70 Umol P fue la fracción más conspicua en la hemolinfa.

En cuerpo graso este fosfolípido alcanzó un nivel de 0,625 Umol P, lo cual es bastante parecido al hallado en la hemolinfa.

Los lípidos neutros estudiados en el cuerpo graso y en la hemolinfa de *Oeceticus platensis*, fueron muy semejantes a los mencionados para *D. saccharalis*.

BIBLIOGRAFIA

- BRAGDON, J., 1951. Determinación de lípidos totales en plasma. Biol. Chem. 1951-1901.
- FOLEN, J., M. LEES y G. M., STANLEY, 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animals tissues. Jour. Biol. Chem. 226: 497-509.
- GILBERT, L., 1967. Lipid Metabolism and Function in Insects. In: Advances in Insect Physiology. Academic Press, 1967.
- HENSLEY, S. y A. HAMMOND, 1968. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. Jour. Econ. Ent. 61 (6): 1742-1743.
- THOMAS, K., 1974. Lipid composition of the fat body and haemolymph and its relation to lipids release in *Oncopeltus fasciatus*. Jour. Ins. Phys. 1974, 20: 845-858.
- WLODAWER, P., E. LAGWŃSKA y J. BARANSKA, 1966. Esterification of fatty acids in the waxmoth haemolymph and its possible role in lipids transport. Jour. Ins. phys. 12: 542-560.

FIG Nº 1

CG

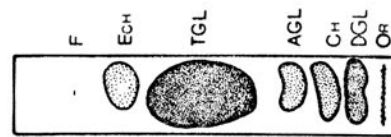
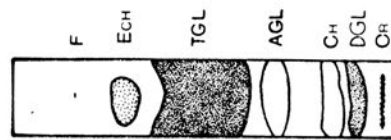
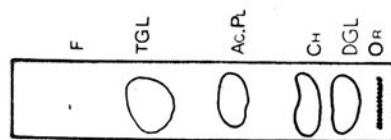
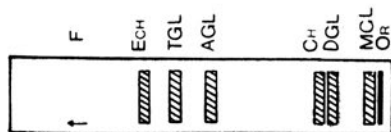
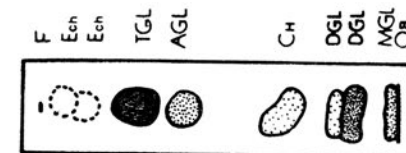
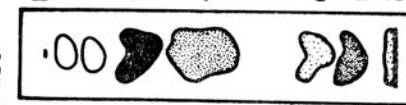
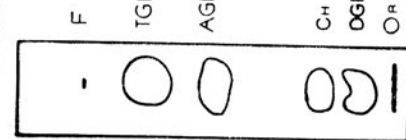
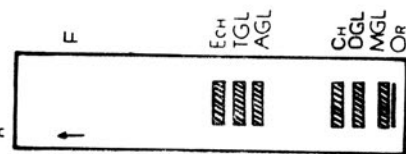


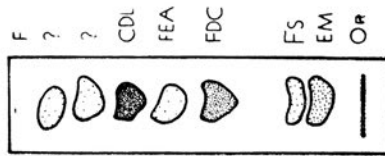
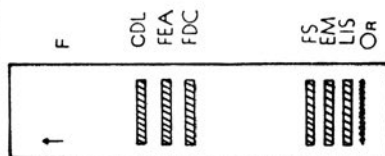
FIG Nº 2

H



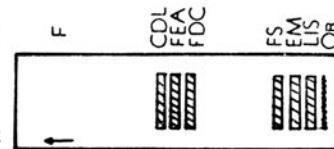
CG

FOSFOLÍPIDOS



H

FOSFOLÍPIDOS



CG = Cuerpo Graso; H Hemolinfa; F = Frente del desarrollo cromatográfico; TGL = Triglicéridos; DGL = Diglicéridos; MGL = Monoglicéridos; Ch = Colesterol; Ech = Esteres del colesterol; CDL = Cardiolina; EM = Esfingomielina; FDC = Fosfatidilcolina; FEA = Fosfatidiletanolamina; FS = Fosfatidilserina; LIS = Lisolecitina; OR = Origen (lugar de siembra de la cromatografía); ? = Fracción no identificada.