



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Presencia de ácidos grasos hidroxilados en tejidos animales y vegetales

Catalina Jaume Bauza

Grado de Bioquímica

Año académico 2014-15

DNI del alumno: 41537280Q

Trabajo tutelado por Dr. Pablo Vicente Escribá Ruiz
Departamento de Biología



Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación.

Palabras clave del trabajo:

Ácidos grasos hidroxilados, ácido 2-hidroxidocosahexaenoico, *Drosophila melanogaster*, ácido 2-hidroxioléico, *Salvia nilotica* y *Salvia viscosa*

ABSTRACT

Fatty acids, specially hydroxylated fatty acids, are able to change the lipid composition of the cell membranes affecting cell signaling pathways and gene expression, thus, reverting the pathological state of the cell. Methylation and trimethylsilylation of fatty acids, followed by gas chromatography analysis allows to distinguish hydroxylated fatty acids from the non-hydroxylated ones, and to quantification them. F1 33771 strain of *Drosophila melanogaster*, which is a fly model for studying Alzheimer's disease, was treated with polyunsaturated hydroxylated and non-hydroxylated fatty acids previously used in antineurodegenerative studies. Subsequent analysis by gas chromatography showed changes of lipid levels after 20 days of treatment, which may reflect the antineurodegenerative effect of the compounds used. Flies treated with hydroxylated fatty acids did not show the presence of any hydroxylated compound into their body, although new non-hydroxylated metabolites, not present in other treatments, were detected. These metabolites may be involved in the recovery of the cognitive level and the lower toxicity of hydroxylated fatty acids to the non-hydroxylated ones. Gas chromatography analysis of *Salvia nilotica* and *Salvia viscosea* lipid extracts showed the presence of the hydroxylated fatty acids, 2-hydroxyoleic acid, 2-hydroxylinoleic acid and 2-hydroxy- α -linolenic acid. However, other species studied of the same genus (*S. officinalis*, *S. verbenaca*) did not show hydroxylated fatty acids in their lipid profile. The presence of these hydroxylated fatty acids in the nature can be used for treating various diseases by means of regulating lipid composition of cell membranes.

RESUM

Els àcids grassos, i en particular els àcids grassos hidroxilats, tenen la capacitat de modificar la composició lipídica de les membranes cel·lulars, afectant a les vies de senyalització cel·lular i a l'expressió gènica, podent revertir l'estat patològic de la cèl·lula. La metilació i trimetilsilanització d'àcids grassos seguida d'un anàlisi per cromatografia de gasos permet distingir els àcids grassos hidroxilats de la resta i la seva posterior quantificació. La soca F1 33771 de *Drosophila melanogaster*, un model de mosca per l'estudi de la malaltia de Alzheimer, es va tractar amb àcids grassos poliinsaturats hidroxilats i no hidroxilats utilitzats prèviament en estudis d'antineurodegeneració. El posterior anàlisi per cromatografia de gasos va mostrar canvis a nivell lipídic després de 20 dies de tractament i que podrien reflectir l'efecte antineurodegeneratiu dels composts emprats. Les mosques tractades amb

àcids grassos hidroxilats no varen mostrar la presència de composts hidroxilats dins el seu organisme, encara que si es varen observar nous metabòlits no hidroxilats i que no es troben presents en la resta de tractaments. Aquests composts podrien estar implicats en el major efecte a nivell cognitiu i menor toxicitat d'aquests àcids grassos hidroxilats respecte als no hidroxilats. En les espècies *Salvia nilotica* y *Salvia viscosa* s'observa la presència d'àcids grassos hidroxilats, 2-hidroxiolèic, 2-hidroxilinolèic i 2-hidroxi- α -linolènic. No obstant, altres espècies estudiades del mateix gènere (*S. officinalis*, *S. verbenaca*) no mostren àcids grassos hidroxilats dins el seu perfil lipídic. La presència en la natura d'aquests àcids grassos hidroxilats amb potencial terapèutic pot ser emprada pel tractament de diferents malalties mitjançant la regulació de la composició lipídica de les membranes.

RESUMEN

Los ácidos grasos, y en particular los ácidos grasos hidroxilados, tienen la capacidad de modificar la composición lipídica de las membranas celulares, afectando a las vías de señalización celular y a la expresión génica, pudiendo revertir el estado patológico de la célula. La metilación y trimetilsilanzación de ácidos grasos seguida de un análisis por cromatografía de gases permite distinguir los ácidos grasos hidroxilados del resto y su posterior cuantificación. La cepa F1 33771 de *Drosophila melanogaster*, un modelo de mosca para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, se trató con ácidos grasos poliinsaturados hidroxilados y no hidroxilados usados previamente en estudios de antineurodegeneración. El posterior análisis por cromatografía de gases mostró cambios a nivel lipídico tras 20 días de tratamiento y que podrían reflejar el efecto antineurodegenerativo de los compuestos usados. Las moscas tratadas con ácidos grasos hidroxilados no mostraron la presencia de compuestos hidroxilados dentro de su organismo, aunque sí se observaron nuevos metabolitos no hidroxilados y que no están presentes en el resto de tratamientos. Estos compuestos podrían estar implicados en el mayor efecto a nivel cognitivo y menor toxicidad de estos ácidos grasos hidroxilados con respecto a los no hidroxilados. En las especies *Salvia nilotica* y *Salvia viscosa* se observa la presencia de ácidos grasos hidroxilados, 2-hidroxioléico, 2-hidroxilinoico y 2-hidroxi- α -linoléico. Sin embargo, otras especies estudiadas del mismo género (*S. officinalis*, *S. verbenaca*) no muestran ácidos grasos hidroxilados dentro de su perfil lipídico. La presencia en la naturaleza de estos ácidos grasos hidroxilados con potencial terapéutico puede ser utilizada para el tratamiento de distintas enfermedades mediante la regulación de la composición lipídica de las membranas.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
MÉTODOS Y TÉCNICAS	11
Materiales.....	11
Extracción lipídica y análisis por cromatografía de gases	11
Análisis estadístico	13
RESULTADOS	14
Detección de DHA en los distintos estadios de <i>Drosophila melanogaster</i>	14
Detección de ácidos grasos hidroxilados y no hidroxilados en <i>Drosophila melanogaster</i> ..	15
Presencia de ácidos grasos hidroxilados en distintas especies de <i>Salvia</i>	18
DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26

INTRODUCCIÓN

La cromatografía de gases se desarrolló por primera vez en los años 50. Inicialmente fue utilizada para estudiar compuestos volátiles que no se descompusieran al calentarse, aunque actualmente se ha ampliado su uso a polímeros que pueden dar lugar a monómeros volátiles [1].

En este tipo de cromatografías, la fase móvil es un gas inerte (nitrógeno, helio, hidrógeno, argón) y la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido. Así, podemos distinguir los dos tipos principales de cromatografías de gases.

- Cromatografía de gas-sólido o cromatografía de adsorción, que se limita al estudio de moléculas polares.
- Cromatografía de gas-líquido o cromatografía de partición. Es la forma más utilizada y en ella, la fase estacionaria líquida no debe ser volátil a las temperaturas usadas durante el análisis y debe tener propiedades similares a las de las muestras.

Las moléculas más volátiles presentan una mayor afinidad por la fase móvil, con la que establecen interacciones más fuertemente y, por tanto, migran más rápidamente. [2]

La cromatografía de gases presenta una alta resolución en la separación de compuestos orgánicos, como los ácidos grasos; aunque la principal limitación de esta técnica es que los solutos deben ser estables a la temperatura requerida para su volatilización. Por tanto, la temperatura es uno de los factores más importantes durante la separación [1].

Los ácidos grasos (FA) son ácidos carboxílicos hidrocarbonados. Normalmente, presentan un número par de átomos de carbono, ya que se sintetizan a partir de moléculas de dos carbonos. En plantas y animales superiores predominan los FA de 16 y 18 átomos de carbono y más de la mitad presentan insaturaciones. En la naturaleza, se encuentran esterificados formando parte de la estructura de lípidos complejos, como triglicéridos, glicerolípidos o esfingolípidos [3].

Algunos FA pueden contener un grupo hidroxilo en su cadena hidrocarbonada, generalmente en el segundo carbono a partir del grupo carboxilo, formando los 2-hidroxiácidos grasos (2OHFA) [4,5]. Son moléculas difíciles de diferenciar de los ácidos grasos no hidroxilados; sin embargo, la puesta a punto de un protocolo específico de derivatización de su grupo hidroxilo mediante la trimetilsilanización permite su detección y cuantificación por cromatografía de gases.

Tanto los 2OHFA como los FA naturales promueven la reorganización de dominios lipídicos de las membranas afectando a los eventos de señalización celular. Cambios en las propiedades físico-químicas de las membranas, como la presión lateral y la fluidez de la membrana, regulan la localización y actividad de proteínas de señalización, lo que puede llevar en última instancia a la modulación de la expresión génica [6]. Así, la regulación adecuada de la composición lipídica de las membranas puede revertir el estado patológico de la célula [7] y en este sentido, los 2OHFA presentan un potencial terapéutico superior al de sus correspondientes FA no hidroxilados.

Algunos 2OHFA han sido propuestos para el tratamiento de distintas enfermedades; como el cáncer, la inflamación, el Alzheimer, la obesidad, la diabetes y lesiones de la médula espinal. El ácido 2-hidroxioléico (2OHOA) se está estudiando en el tratamiento de lesiones de la médula espinal, hipertensión, diabetes y obesidad [6]. Se ha demostrado que es capaz de reducir la presión sanguínea en ratas hipertensas mediante la modulación de la composición lipídica y las propiedades de las membranas [8]. Además, también se está estudiando para el tratamiento de gliomas y tumores sólidos en ensayos clínicos de fase I/II (código NCT01792310) [9]. El ácido 2-hidroxiaraquidónico (2OHARA) se ha demostrado su eficiencia como anti-inflamatorio no esteroideo, al inhibir la actividad de COX1 y COX2, reduciendo la síntesis de mediadores pro-inflamatorios. Además, tiene la capacidad de disminuir los niveles de TNF α [10].

Finalmente, el ácido 2-hidroxicosahexaenóico (2OHDHA) se presenta como un potente candidato para revertir las deficiencias cognitivas asociadas a procesos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer [6]. El DHA es el ácido graso poliinsaturado (PUFA) omega-3 más abundante del cerebro y está implicado en el desarrollo, neuroprotección y funciones sinápticas y cognitivas [7,11]. Además, se ha relacionado con la neurogénesis. El 2OHDHA, al ser un derivado hidroxilado del DHA, puede actuar a través de las mismas vías; por lo que podría ejercer sus efectos sobre las mismas funciones al igual que otros derivados naturales del DHA, como la neuroprotectina D1 (NPD1). El tratamiento con 2OHDHA y DHA produce un aumento de la neurogénesis, la cual está disminuida en ratones transgénicos modelos de Alzheimer (ratones 5XFAD) [11]. Además, presenta una capacidad neuroprotectora y anti-apoptótica que promueve la supervivencia celular ayudando al mantenimiento del hipocampo [7,11]. Por otro lado, el 2OHDHA puede modular la composición lipídica de las membranas cerebrales incrementando la presencia de PUFAs de

cadena larga en la fosfatidiletanolamina. También se ha asociado a una disminución de los péptidos β -amiloides y de la hiperfosforilación de Tau en ratones 5XFAD [7].

La observación de los efectos positivos de algunos 2OHFA frente a diversas enfermedades, en particular en el campo de la neuroprotección, propició que surgiera un interés en evaluar de forma rápida y sencilla su toxicidad y su capacidad de revertir procesos neurodegenerativos. En este sentido, la mosca *Drosophila melanogaster* es una herramienta ideal debido a su corto ciclo biológico. En concreto, la cepa F1 33771 de *Drosophila melanogaster*, un modelo para la enfermedad de Alzheimer, se usó para testar tanto la toxicidad como la recuperación de capacidades cognitivas de los tratamientos con ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) y sus respectivos derivados 2-hidroxilados (2OHARA, 2OHEPA, 2OHDHA, respectivamente).

En la **Tabla 1** se muestran los datos de supervivencia de las moscas sometidas a los tratamientos antes mencionados. Los valores de supervivencia se expresan en el número de días transcurridos desde la transformación en mosca adulta y hasta que el número de las mismas desciende al 50%. Este valor es de 14.5 días para las moscas no tratadas y aumenta en cualquiera de los tratamiento. En términos generales, la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es donde se alcanzan los mayores valores de supervivencia; sin embargo, este valor disminuye en la concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta casi igualar los valores del grupo no tratado. Por otro lado, todos los tratamientos con 2OHFA provocan que las moscas vivan más tiempo en comparación con los análogos no hidroxilados.

Tabla 1. Evaluación de la toxicidad de diversos ácidos grasos hidroxilados y no hidroxilados a distintas concentraciones en cepas F1 33771 de *Drosophila melanogaster*. Los datos representan el número de días transcurridos desde el inicio del estadio adulto hasta que sobreviven el 50% de los individuos.

Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						
	0	1	3	10	30	100	250
ARA	14,5	14,6	14,7	15	16,2	16,1	14,8
2OH-ARA	14,5	14,6	14,8	15,3	17,6	16,5	15
EPA	14,5	14,6	14,7	14,9	16,4	16,6	14,7
2OH-EPA	14,5	14,7	14,8	15,3	16,9	17,7	14,9
DHA	14,4	14,4	14,5	14,5	15	15,8	14,5
2OH-DHA	14,4	14,5	14,6	14,8	16,6	16,8	14,6

En consonancia con la evaluación de la toxicidad se llevó a cabo el *climbing test* para evaluar el estado cognitivo de las cepas F1 33771 de *Drosophila melanogaster* tras el tratamiento con diferentes ácidos grasos. En este test se determinó el índice de rendimiento, el cual hace referencia a la proporción de moscas de cada grupo que superaban una prueba consistente en sobrepasar una línea dibujada en un tubo cilíndrico puesto en posición vertical en un tiempo dado y partiendo todas desde la base de dicho tubo. Los valores de este índice disminuyen a medida que pasa el tiempo; sin embargo al comparar la cepa F1 con un grupo de moscas estándar, se observa que el índice de rendimiento desciende más rápidamente en las cepas F1, hecho que se asocia a un mayor deterioro cognitivo.

En la **Tabla 2** se muestran los resultados del *climbing test* para cada tratamiento en moscas de la cepa F1 33771. Los valores representan el número de días transcurridos desde el inicio del estadio adulto hasta que solo el 50% de las moscas superaron la prueba. En las moscas tratadas con 2OHFA, el deterioro cognitivo se presentó más tarde que en el caso de las moscas tratadas con sus correspondientes ácidos grasos no hidroxilados, un resultado que discurre en paralelo con el de la toxicidad. Por tanto, a la vista de estos datos, los 2OHFA analizados presentan un potencial terapéutico superior al de los ácidos grasos no hidroxilados, tal y como se ha mencionado anteriormente [6]. Además, igual que en el caso de la toxicidad, todos los tratamientos presentan una mayor eficacia en la concentración de 100 µg/mL.

Tabla 2. *Climbing test* en la cepa F1 33771 de *Drosophila melanogaster* tratadas con diferentes concentraciones de distintos ácidos grasos 2-hidroxilados y sus análogos no hidroxilados. Los datos representan el tiempo (días) en que solo el 50% de las moscas superaron el test.

Tratamiento	Concentración (µg/mL)						
	0	1	3	10	30	100	250
ARA	17,7	17,8	17,9	18	20,4	20,1	17,8
2OH-ARA	17,7	17,9	18	18,6	21,7	22,4	17,9
EPA	17,7	17,8	17,9	18	19,4	20,5	17,6
2OH-EPA	17,7	17,8	18	19,1	21,8	22,4	17,8
DHA	17,6	17,7	17,9	18,8	20,1	20,3	17,8
2OH-DHA	17,6	17,8	18	19,2	23,9	22,3	17,9

Estos resultados, obtenidos en estudios anteriores, han suscitado un gran interés por encontrar derivados hidroxilados de ácidos grasos en muestras biológicas, tanto animales como vegetales, ya que podrían por un lado sustituir a sus análogos sintéticos utilizados

hasta ahora y por otro, podrían ayudar a elucidar el mecanismo de acción de estos compuestos. En animales superiores podemos encontrar el ácido cerebrónico (2-hidroxi C24:0) y el ácido hidroxinervónico (2-hidroxi C24:1) [4,5], localizados en el sistema nervioso como componentes de las esfingomielinas y que están relacionados con enfermedades neurodegenerativas causadas por la destrucción de las vainas de mielina [12]. Además, los derivados hidroxilados del DHA también pueden encontrarse en resolvinas [13]. En muestras vegetales se ha detectado la presencia del ácido 10-hidroxi-2-decenoico [14], ácido 2-hidroxi-tetracosanoico [15] y ácido ricinoleico (12-hidroxi C18:1) en el aceite de ricino [5]. El ácido 2-hidroxi-tetracosanoico forma parte del perfil lipídico obtenido a partir de extractos de las raíces de *Boerhaavia paniculata*, las cuales presentan actividad anti-inflamatoria [15]. Los aceites de semillas de *Thymus vulgaris* están enriquecidos en ácido 2-hidroxilinolénico (13%) [16] y los de semillas de *Salvia nilotica* contienen ácido 2-hidroxioléico (0.6%), 2-hidroxiloléico (4.2%) y 2-hidroxilinolénico (5.4%) [17].

A pesar de que la hidroxilación del carbono 2 es la más común [4], también se han identificado ácidos grasos hidroxilados con el grupo hidroxilo en distinta posición. Un ejemplo de ello es *Xanthomonas sinensis*, un patógeno vegetal, en el cual predominan los 3-hidroxiácidos grasos, como los ácidos D-3-hidroxi-9-metil-decanoico, D-3-hidroxi-dodecanoico y D-3-hidroxi-11-metil-dodecanoico; aunque también contiene pequeñas cantidades de ácidos D-3-hidroxi-decanoico y 2-hidroxi-9-metil-decanoico. En otras especies de *Xanthomonas* y *Myxobacteria* se han identificado patrones similares [18].

El presente trabajo tiene como objetivos:

1. Estudiar la composición de ácidos grasos en la cepa modelo de Alzheimer F1 33771 de *Drosophila melanogaster* que ha sido tratada con 100 µg/mL de ácidos grasos no hidroxilados (ARA, EPA, DHA), 2-hidroxiolados (2OH-ARA, 2OH-EPA, 2OH-DHA) o un compuesto denominado DHALifort, que está formado por un 50% de aceite de pescado enriquecido en ácidos grasos omega-3 y 50% de 2OHDHA.
2. Detectar la presencia de ácidos grasos 2-hidroxiolados en diferentes especies de *Salvia*.

MÉTODOS Y TÉCNICAS

Materiales

El cloroformo, metanol y hexano eran de Scharlab (Barcelona, España). El cloruro de acetilo, el N,O-bis(trimetilsilil) acetamida, el ácido margárico y los patrones de ácidos grasos no hidroxilados se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). ARA, EPA y DHA eran de BASF Pharma (Callanish, UK) y todos los derivados 2-hidroxilados de ácidos grasos fueron proporcionados por Lipopharma Therapeutics, S.L. (Palma, España).

Las semillas de *Salvia nilotica* y *Salvia viscosa*, pertenecientes a la familia de las lamiáceas [19,20], se adquirieron de un vendedor particular en Ebay (<http://www.ebay.es/>). Las semillas de *Salvia officinalis* y *Salvia verbenaca* fueron recolectadas en el campo (Mallorca).

Tratamiento de *Drosophila melanogaster* con ácidos grasos

Las moscas de la cepa F1 33771 se alimentaron con una dieta suplementada con 100 µg/mL de ARA, EPA, DHA, DHAifort, 2OH-ARA, 2OH-EPA y 2OH-DHA durante la etapa larvaria y adulta. Las muestras no tratadas con ácidos grasos no recibieron ningún tipo de suplemento adicional. 20 días después de la formación de los adultos, las moscas se congelaron y las cabezas fueron recogidas y almacenadas a -80°C.

Extracción lipídica y análisis por cromatografía de gases

Las cabezas de *Drosophila melanogaster* y las semillas aplastadas de las cuatro especies del género *Salvia* (aproximadamente 20 mg por muestra) se incubaron en 3 mL de cloroformo:metanol (2:1; v:v) durante 48 horas en una atmósfera inerte de argón a temperatura ambiente [21]. Una vez las cabezas de las moscas se hubieron hundido al fondo del vial se homogenizaron a 4°C usando un homogenizador Kinematica Polytron PT3100 (Luzern, Suiza). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 1000 xg durante 10 minutos a 4°C y el sedimento resultante se lavó con 3 mL de cloroformo:metanol (2:1; v:v). A los sobrenadantes obtenidos, que contienen los lípidos, se les añadió 0,2 volúmenes de NaCl al 0,9%. La solución resultante se agitó y centrifugó a 1000 xg, 10 minutos a 4°C. La fase orgánica se evaporó en un tubo previamente pesado, que después se colocó en condiciones de vacío durante 12 horas para eliminar las trazas de disolvente. La masa de lípido extraído se calculó por diferencia de pesos entre el tubo con lípido después de la evaporación y el tubo vacío. A la mezcla de lípidos se le añadió 1 µmol de ácido margárico, utilizado como patrón interno para el análisis por cromatografía de gases. Los lípidos se resuspendieron en 166 µL de hexano para disolver los lípidos más apolares, como los triglicéridos. La

transmetilación de los ácidos grasos se llevó a cabo mediante la incubación de los lípidos en 3 mL de metanol:cloruro de acetilo (10:1; v:v) a 100°C, durante 90 minutos, en una atmósfera inerte de argón en tubos pyrex [22]. El metanol actúa como donador del grupo metilo y el cloruro de acetilo proporciona el medio ácido necesario para la reacción de transmetilación.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se extrajeron añadiendo 3 mL de H₂O y 1 mL de hexano a la reacción de transmetilación. Después de agitar, las muestras se centrifugaron a 1000 xg, 10 minutos a temperatura ambiente. La fase superior, que contiene los FAMEs, se recogió y el precipitado se lavó dos veces con 1 mL de hexano. Los sobrenadantes recogidos se evaporaron bajo un flujo de argón y se resuspendieron en 1 mL de hexano. 500 µL se retiraron para el análisis posterior por cromatografía de gases. El volumen restante se evaporó para la segunda derivatización, que consiste en la adición de un grupo trimetilsilano (TMS) al grupo hidroxilo libre de los ácidos grasos. Esta modificación química mejora la volatilización del compuesto dentro de la cámara de inyección del cromatógrafo [23]. La segunda derivatización se realizó añadiendo el reactivo N,O-bis(trimetilsilil) acetamida (200-400 µL 0,1-5,0 mg de lípido) y calentando el vial tapado durante 30 minutos a 70°C. A continuación, el disolvente se evaporó y los lípidos metilados y trimetilsilanizados (FAME-TMS) se resuspendieron en 500 µL de hexano antes de su análisis por cromatografía de gases **(Figura 1)**.

Los FAMEs y los FAME-TMS se analizaron mediante un sistema de cromatografía de gases Agilent 7890A, equipado con un detector de ionización de llama y un auto-inyector 7693 (Santa Clara, CA). La columna capilar Agilent J&W HP-88 (30 m x 0,25 mm x 0,20 µm) fue utilizada con 1,3 mL/min de helio como gas portador y un *split ratio* de 5:1. La columna fue equilibrada a 130°C durante 5 minutos, la temperatura fue incrementando hasta 160°C a una velocidad de 2,5°C/min y luego, a 220°C a una velocidad de 2°C/min. Finalmente, la columna se mantuvo a 220°C durante 5 minutos. La temperatura del inyector y del detector se fijó a 250°C durante toda la medida. Las áreas de los picos que aparecen en los cromatogramas se cuantificaron usando el estándar interno, ácido margárico, y corregidas con el peso calculado del lípido extraído. La identificación de los picos se llevó a cabo utilizando estándares de ácidos grasos hidroxilados y no hidroxilados.

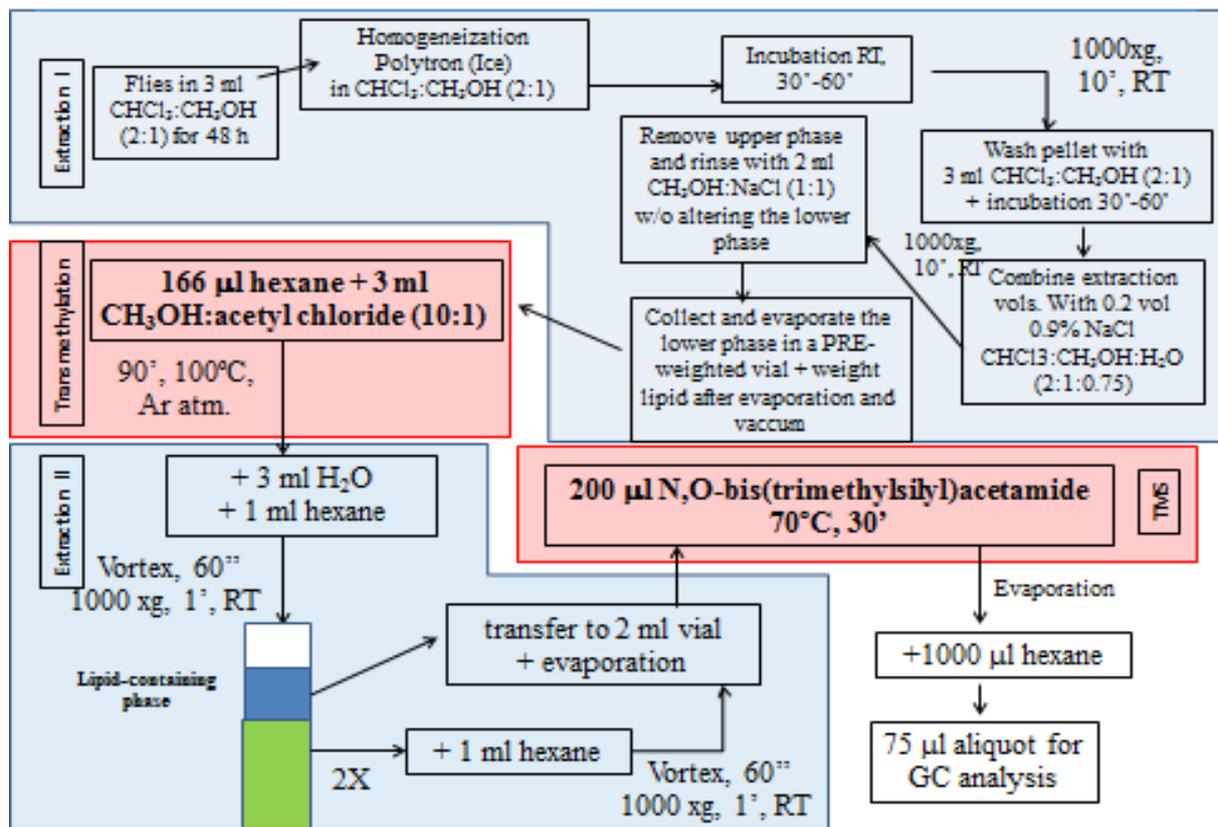


Figura 1. Esquema del protocolo de la extracción lipídica realizada tanto en las muestras de *Drosophila melanogaster* tratadas con distintos ácidos grasos hidroxilados y no hidroxilados y en las semillas del género *Salvia*.

Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre parejas de datos se determinó mediante el test de la t de Student con un nivel de significación de 95% de confianza ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Detección de DHA en los distintos estadios de *Drosophila melanogaster*

Con el objetivo de poner a punto un protocolo de detección de ácidos grasos en *Drosophila melanogaster* se realizó un estudio piloto tratando a las moscas con 0 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DHA desde el estadio larvario y hasta el vigésimo día del estadio adulto. Posteriormente se analizaron los ácidos grasos de las moscas en todos sus estadios (larva, pupa, cuerpo entero adulto y cabezas de individuos adultos) mediante cromatografía de gases (**Figura 2**). En las muestras de moscas no tratadas se observó una ausencia de DHA tal y como era de esperar, ya que este PUFA no forma parte de la composición lipídica natural de *Drosophila melanogaster* [24,25]. En cambio, la presencia de DHA fue detectada en todas las muestras de las moscas tratadas. La menor concentración de DHA fue hallada en las muestras obtenidas a partir del cuerpo entero de las moscas adultas, con un valor de 1.01 nmoles/mg lípido. Por otro lado, las muestras que presentaron una concentración mayor, concretamente de 8.1 nmoles/mg lípido, fueron las obtenidas a partir de las cabezas de moscas adultas. Las larvas y pupas arrojan valores intermedios, de 1.9 y 2.2 nmoles/mg lípido, respectivamente (**Figura 2**).

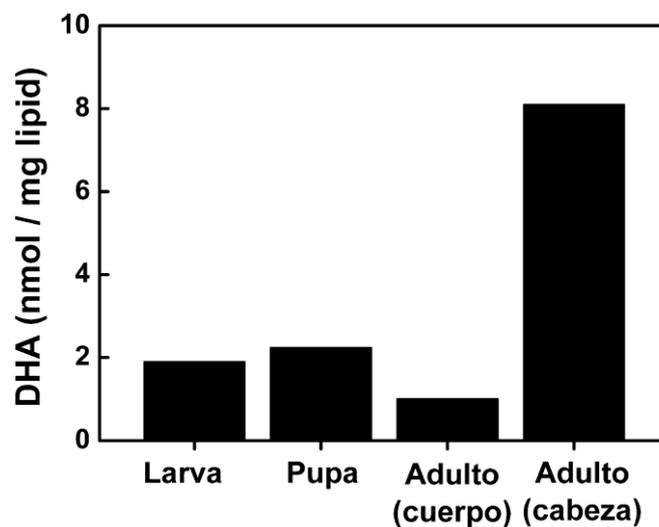


Figura 2. Presencia de ácido docosahexaenoico (DHA) en diferentes estadios de las cepas F1 33771 de *Drosophila melanogaster*. La comida de las moscas se suplementó con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y tras la recolección de las muestras, se extrajeron los lípidos, se derivatizaron de acuerdo al protocolo descrito y se analizó la presencia de DHA por cromatografía de gases.

Detección de ácidos grasos hidroxilados y no hidroxilados en *Drosophila melanogaster*

Se analizó el perfil lipídico de las cabezas de la cepa F1 33771 de *Drosophila melanogaster* tras el tratamiento con 100 µg/mL de los distintos ácidos grasos hidroxilados y no hidroxilados. En el estudio, además de analizar la presencia del lípido usado en el tratamiento, también se estudiaron los niveles de los siguientes ácidos grasos no hidroxilados: láurico (12:0), mirístico (14:0), miristoleico (14:1), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), α -linolénico (18:3n-3), araquídico (20:0), araquidónico (20:4n-6), eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) y docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3) (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de ácidos grasos de las cabezas de *Drosophila melanogaster* tratadas con 100 µg/mL de diferentes ácidos grasos hidroxilados y no hidroxilados. Los valores representan la media \pm EEM de 2-4 muestras diferentes para el mismo tratamiento y expresados como nmol/mg lípido.

FA	Control	ARA	2OHARA	EPA	2OHEPA	DHA	DHALifort	2OHDHA
12:0	157.9 \pm 35.7	110.5 \pm 30.6*	69.6 \pm 3.3*	80.4 \pm 13.5*	83.5 \pm 3.1*	98.1 \pm 7.6*	82.2 \pm 16.2*	120.5 \pm 27.2*
14:0	668.3 \pm 25.4	515.1 \pm 75.7	326.9 \pm 1.5*	274.5 \pm 2.9*	383.9 \pm 2.3*	484.6 \pm 4.3*	436.7 \pm 15.1*	592.1 \pm 64.9
14:1n-5	34.5 \pm 3.0	27.6 \pm 3.9	15.8 \pm 0.1*	17.5 \pm 0.8*	20.1 \pm 0.2*	24.7 \pm 0.6*	20.1 \pm 0.7*	30.7 \pm 3.7
16:0	704.3 \pm 16.2	706.9 \pm 21.7	715.1 \pm 1.6	555.9 \pm 1.4*	660.7 \pm 5.8	709.9 \pm 1.9	755.9 \pm 10.0*	649.5 \pm 19.6
16:1n-7	502.2 \pm 4.2	507.4 \pm 8.2	437.4 \pm 0.5*	413.6 \pm 2.2*	438.5 \pm 4.2*	516.1 \pm 0.9	435.7 \pm 7.5*	502.4 \pm 3.0
18:0	106.8 \pm 1.8	138.9 \pm 9.6 [#]	142.6 \pm 0.1 [#]	226.3 \pm 4.0 [#]	126.7 \pm 1.6 [#]	175.8 \pm 0.6 [#]	167.6 \pm 16.5 [#]	156.1 \pm 4.6 [#]
18:1n-9	571.5 \pm 22.4	653.3 \pm 47.1	698.1 \pm 0.6 [#]	758.8 \pm 6.3 [#]	679.1 \pm 5.4 [#]	687.3 \pm 3.1 [#]	695.7 \pm 14.6 [#]	627.8 \pm 41.6 [#]
18:2n-6	542.2 \pm 19.8	519.6 \pm 47.9	749.7 \pm 2.2 [#]	667.4 \pm 9.6 [#]	508.8 \pm 5.8	512.3 \pm 3.3	541.1 \pm 17.1	428.4 \pm 38.2*
18:3n-3	115.9 \pm 9.2	120.3 \pm 9.8	134.5 \pm 2.1	173.7 \pm 0.1 [#]	88.5 \pm 0.1	120.3 \pm 2.8	105.2 \pm 2.1	123.5 \pm 3.1
20:0	12.2 \pm 0.4	17.1 \pm 0.9 [#]	16.6 \pm 0.6 [#]	26.28 \pm 0.3 [#]	16.9 \pm 8.3 [#]	16.8 \pm 0.2 [#]	16.9 \pm 0.7 [#]	18.0 \pm 1.7 [#]
20:4n-6	ND	71.7 \pm 8.5 [#]	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20:5n-3	ND	ND	ND	115.2 \pm 5.0 [#]	ND	42.6 \pm 1.5 [#]	42.7 \pm 2.5 [#]	ND
22:6n-3	ND	ND	ND	ND	ND	1.6 \pm 0.3 [#]	ND	ND

ARA, ácido araquidónico; 2OHARA, 2-hidroxiaraquidónico; EPA, ácido eicosapentaenóico; 2OHEPA, ácido 2-hidroxi-eicosapentaenóico; DHA, ácido docosahexaenóico; 2OHDHA, ácido 2-hidroxi-docosahexaenóico; DHALifort, fórmula enriquecida con ácidos grasos omega-3 y 2OHDHA; ND, no detectado. (*) Disminución estadísticamente significativa comparada con las muestras control ($p \leq 0.05$). ([#]) Aumento estadísticamente significativo comparado con las muestras control ($p \leq 0.05$).

El tratamiento de las moscas con cualquier componente hidroxilado o no hidroxilado provoca cambios en el perfil lipídico de *Drosophila melanogaster*. Las muestras control, no tratadas, contienen aproximadamente 56% molar de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) (12-16 átomos de carbono) y un 36% molar de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) (≥ 18

átomos de carbono). El restante 8% molar corresponde a ácidos grasos minoritarios y no identificados. Las cantidades de SCFA disminuyeron en los tratamientos con ARA, EPA y DHA proporcionando los valores 51%, 36% y 49% molar respectivamente. La disminución en las muestras tratadas con 2OHFA fue similar: 42%, 42%, 51% y 46% molar para 2OHARA, 2OHEPA, 2OHDHA y DHAlifort, respectivamente. Además, el contenido en LCFA aumentó en todos los tratamientos (**Figura 3**). Este incremento no se debe únicamente a la presencia de los FA utilizados en el tratamiento, sino que se apreció también un aumento de otras especies de ácidos grasos. Esto implica una regulación de las vías implicadas en el catabolismo y/o anabolismo de ácidos grasos.

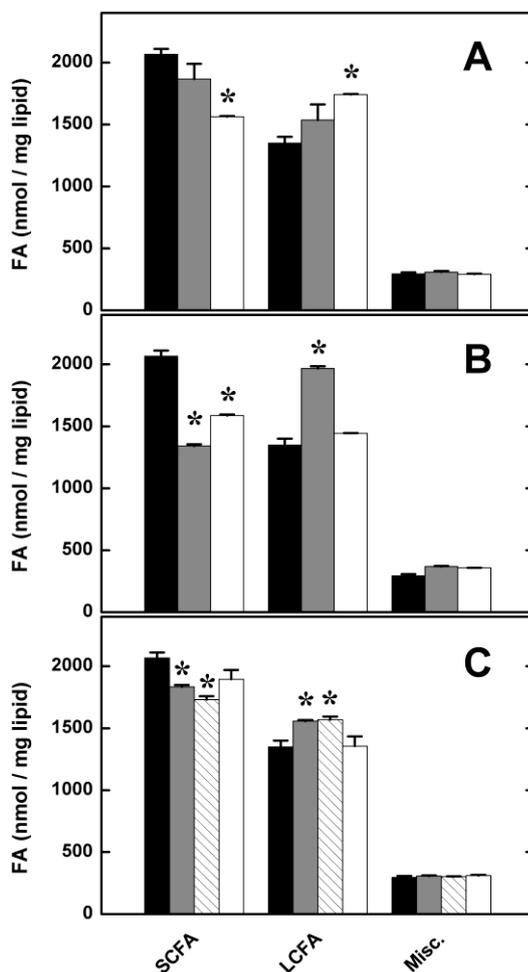


Figura 3. Perfil lipídico de las cabezas de *Drosophila melanogaster* tras ser alimentadas con (A) ARA y 2OHARA; (B) EPA y 2OHEPA; (C) DHA, DHAlifort y 2OHDHA. En todos los casos, las muestras de moscas no tratadas con ningún suplemento alimenticio se muestran en las barras negras; los suplementos de ácidos grasos no hidroxilados con barras grises; los hidroxilados con barras blancas y en el caso del DHAlifort con barras rayadas. Un conjunto de aproximadamente 20 picos minoritarios presentes en todos los extractos lipídicos se agruparon bajo la denominación “misceláneo” (Misc.) para facilitar la comprensión. Los datos son valores medios \pm EEM de 2-4 experimentos independientes. (*) Indica diferencias estadísticas significativas (valor $p \leq 0.05$) comparado con las muestras no tratadas (control).

Las muestras control carecen de PUFAs de 20 y 22 átomos de carbono, de acuerdo a lo descrito en la literatura [24,25]. Sin embargo, el tratamiento con ARA, EPA y DHA induce la aparición de estos compuestos en el perfil lipídico de las moscas. Por tanto, los FAs utilizados en el tratamiento son absorbidos e incorporados en los tejidos. En las muestras tratadas con

DHA se puede detectar la presencia de DHA (22:6n-3) y EPA (20:5n-3). Curiosamente, la concentración de EPA (42.6 ± 1.5 nmoles/mg lípido) es superior a la de DHA (1.6 ± 0.3 nmoles/mg lípido) (**Tabla 3**), lo que sugiere una rápida conversión de 22:6n-3 en 20:5n-3 [24].

Por otro lado, el tratamiento con 2OHFA, tales como 2OHARA, 2OHEPA y 2OHDHA, en una concentración de 100 µg/mL no induce la presencia de estos compuestos hidroxilados en las cabezas de las moscas tratadas, lo que sugiere que *Drosophila melanogaster* no tiene la capacidad de asimilarlos como tal en su organismo, pero sí posee los enzimas necesarios para su metabolización. Prueba de ello es la presencia de metabolitos que no están presentes en las moscas no tratadas o tratadas con ácidos grasos no hidroxilados (**Figura 4**). Estos nuevos metabolitos corresponden a compuestos no hidroxilados, ya que sus picos cromatográficos muestran el mismo tiempo de retención en las muestras que presenta una y dos derivatizaciones. La segunda derivatización permite distinguir los compuestos hidroxilados porque la adición del grupo TMS únicamente se produce en los grupos hidroxilos libres y por tanto el compuesto presenta un tiempo de retención diferente. Así pues, los 2OHFAs utilizados en los tratamientos son metabolizados y transformados en compuestos no hidroxilados.

El DHAlifort, utilizado como tratamiento para la cepa F1 de *Drosophila melanogaster*, está compuesto por una mezcla de 2OH-DHA y aceite de pescado enriquecido con PUFAs omega-3 (1:1, v:v). En este caso, los cromatogramas tampoco mostraron un pico con el mismo tiempo de retención que el estándar 2OH-DHA; aunque se observó la presencia de los picos que corresponden a los metabolitos detectados en las muestras tratadas con 2OH-EPA y 2OH-DHA (**Figura 4**). Además, aparece el EPA en una concentración de 42.7 ± 2.5 nmoles/mg lípido debido a la presencia de EPA y DHA en el extracto lipídico (**Tabla 3**).

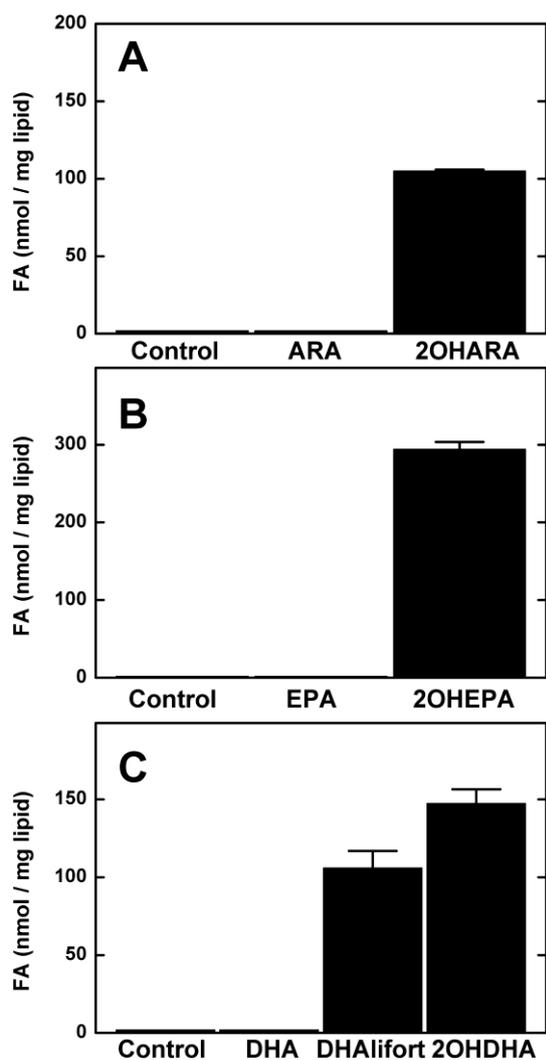


Figura 4. Análisis por cromatografía de gases de los metabolitos lipídicos derivados de la metabolización de los 2-hidroxiácidos grasos utilizados en el tratamiento de *Drosophila melanogaster*. La suma de los picos cromatográficos no identificados presentes en los extractos lipídicos de las moscas tratadas con 100 µg/mL de 2OHARA, 2OHEPA, 2OHDHA y DHAIfort se comparó con los de los extractos lipídicos del control y de los tratamientos con ácidos grasos no hidroxilados. Los datos se muestran como la media ± EEM de 2-4 muestras diferentes para el mismo tratamiento.

Presencia de ácidos grasos hidroxilados en distintas especies de *Salvia*

Los cromatogramas obtenidos tras el análisis lipídico de semillas de *Salvia nilótica* y *Salvia viscosa* mostraron la presencia de ácidos grasos hidroxilados. La determinación de estos picos fue posible gracias al protocolo de derivatización utilizado, ya que en las muestras con una sola derivatización los picos hidroxilados presentan un tiempo de retención más tardío que en las muestras sometidas a las dos derivatizaciones. Esto es debido a que la adición del grupo TMS al hidroxilo favorece la volatilización de los compuestos hidroxilados [23]. Los estándares utilizados permitieron la identificación de estos ácidos grasos hidroxilados como 2-hidroxioléico (2OHOA, 2OH-18:1n-9), 2-hidroxilinoleico (2OHLA, 2OH-18:2n-6) y 2-hidroxi- α -linolénico (2OH α LNA, 2OH-18:3n-3) (**Figura 5A**). También se analizó la presencia de estos ácidos grasos hidroxilados en las especies *Salvia officinalis* y *Salvia verbenaca*, pero en este caso no se observaron picos hidroxilados (**Figura 5B**).

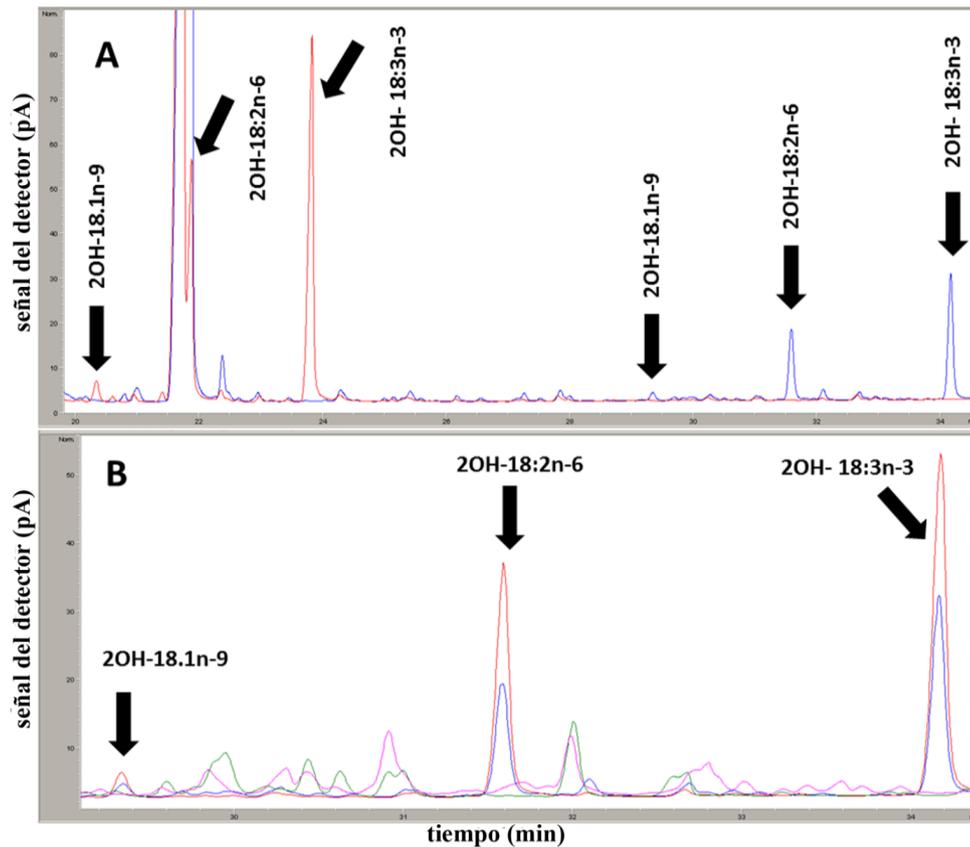


Figura 5. Cromatogramas obtenidos por cromatografía de gases de extractos lipídicos de plantas del género *Salvia*. (A) Análisis cromatográfico de ácidos grasos de *Salvia viscosa* sometidos a una metilación (azul) o a una metilación seguida de una trimetilsilanicación (rojo). Se observan tres picos pertenecientes a ácidos grasos hidroxilados identificados como 2-hidroxioléico (2OH-C18:1n-9), 2-hidroxilinooleico (2OH-C18:2n-6) y 2-hidroxi- α -linolénico (2OH-C18:3n-3). Estos picos presentan un tiempo de retención diferente dependiendo de la derivatización a la que haya sido sometida la muestra, mientras que el resto de picos cromatográficos no varían su tiempo de retención independientemente de si han sido sometidos a la reacción de trimetilsilanicación. (B) Cromatograma de un extracto lipídico de semillas del género *Salvia* donde se muestran identificados con una fecha los picos pertenecientes al derivado metilado de 2-hidroxioléico, 2-hidroxilinooleico y 2-hidroxi- α -linolénico, presentes en *S. viscosa* (azul), *S. nilotica* (rojo). Estos picos no están presentes en muestras de *S. officinalis* (verde) y *S. verbenaca* (rosa).

Al estudiar la composición lipídica de las semillas de *Salvia nilotica* y *Salvia viscosa* también se detectaron y analizaron los ácidos grasos palmítico (16:0), palmitoleico (16:1n-7), esteárico (18:0), oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6) y α -linolénico (18:3n-3), además de los 2OHFAs ya mencionados (**Tabla 4**). Las dos especies presentaron un perfil lipídico similar en cuanto a los ácidos grasos no hidroxilados, entre los que predominan 18:2n-6 y 18:3n-3 representando el 35.8 y 32.7% molar en el caso de *S. nilotica* y 34.2 y 35.2% molar en *S. viscosa*, respectivamente. Esta similitud no se conserva en el caso de los 2OHFAs, puesto que

en *S. nilotica* estos presentan una concentración superior que en *S. viscosa*. En *S. nilotica* los ácidos 2OHOA, 2OHLA y 2OH α LNA presentan una concentración de 0.4 ± 0.04 , 4.7 ± 0.5 y 7.1 ± 0.7 % molar, respectivamente. Estos valores se correlacionan con los hallazgos obtenidos en 1975, donde las cantidades detectadas de 2OHOA, 2OHLA y 2OHLNA fueron 0.6, 4.2 y 5.4% molar, respectivamente [17]. Sin embargo, la concentración de estos ácidos grasos se vio reducida en *S. viscosa*, mostrando valores de 0.08 ± 0.01 % molar para 2OHOA, 0.9 ± 0.08 % molar para 2OHLA y 1.77 ± 0.2 % molar para 2OH α LNA.

Tabla 4. Composición de ácidos grasos de *Salvia nilotica* y *Salvia viscosa*. Los extractos lipídicos de semillas de ambas plantas se derivatizaron y se analizaron mediante cromatografía de gases. Los datos se expresan en % molar y nmol/mg lípido. El grupo misceláneo corresponde a una serie de picos minoritarios no identificados.

FA	% molar		nmol/mg lípido	
	<i>S. nilotica</i>	<i>S. viscosa</i>	<i>S. nilotica</i>	<i>S. viscosa</i>
16:0	9.5 ± 0.2	9.2 ± 0.03	324.8 ± 8.3	317.9 ± 1.05
16:1n-7	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.01	1.9 ± 0.04	2.7 ± 0.04
18:0	3.2 ± 0.06	2.5 ± 0.01	120.3 ± 2.7	95.8 ± 0.05
18:1n-9	6.3 ± 0.2	13.75 ± 0.02	237.2 ± 6.4	522.2 ± 0.8
18:2n-6	35.8 ± 0.9	34.2 ± 0.1	1343.7 ± 35.0	1288.6 ± 5.0
18:3n-3	32.7 ± 0.9	35.2 ± 0.02	1220.9 ± 35.7	1315.9 ± 0.9
2OH-18:1n-9	0.4 ± 0.04	0.08 ± 0.01	16.1 ± 0.17	3.2 ± 0.3
2OH-18:2n-6	4.7 ± 0.5	0.9 ± 0.08	185.0 ± 19.0	34.8 ± 3.6
2OH-18:3n-3	7.1 ± 0.7	1.77 ± 0.2	278.1 ± 28.1	70.2 ± 6.9
Misceláneo	2.7 ± 0.01	2.8 ± 0.3	106.7 ± 0.04	110.4 ± 10.3

DISCUSIÓN

En el tratamiento de las moscas con DHA, la mayor concentración de este compuesto se halló en la cabeza de las moscas en el estadio adulto en comparación con las larvas, las pupas y el cuerpo entero adulto. Esto hizo pensar en que las cabezas de las moscas podrían ser la parte del insecto que permitiría detectar la mayor cantidad de ácidos grasos utilizados en este y el resto de tratamientos. El DHA (22:6n-3) se trata de un PUFAs de cadena larga, por lo que su detección se debe únicamente a la absorción e incorporación del compuesto en el organismo de las moscas; ya que el perfil lipídico de *Drosophila melanogaster* consta de ácidos grasos simples mayoritariamente de cadena corta y carece de PUFAs de 20 y 22 átomos de carbono [24,25].

Los diferentes ácidos grasos poliinsaturados, tanto hidroxilados como no hidroxilados, utilizados para el tratamiento de la cepa F1 33771 de *Drosophila melanogaster* provocaron cambios en el perfil lipídico de las moscas (**Tabla 3, Figura 3**). En todos los tratamientos, se observó una disminución de los ácidos grasos de cadena corta y un aumento de los ácidos grasos de cadena larga. Sin embargo, este aumento no se explica únicamente por la presencia de los compuestos del tratamiento (ARA, EPA o DHA) en el organismo de los insectos, si no que se da una síntesis de otros lípidos. En las moscas alimentadas con ácidos grasos no hidroxilados (ARA, EPA y DHA) se pudieron observar los picos correspondientes a estos compuestos tras el análisis mediante cromatografía de gases. Curiosamente, en el tratamiento con DHA (22:6n-3) también se observó un pico de EPA (20:5n-3). Los niveles de 20:5n-3 y 22:6n-3 fueron 42.6 ± 1.5 y 1.6 ± 0.3 nmoles/mg lípidos, respectivamente, lo que sugiere que aproximadamente el 95% de 22:6n-3 fue convertido en 20:5n-3. Esta rápida metabolización de DHA en EPA se correlaciona con los estudios publicados previamente, donde se describe una conversión de DHA en EPA de aproximadamente el 85% [24]. En mamíferos, los ácidos grasos omega-3, como el 20:5n-3 y el 22:6n-3, son sintetizados por la misma vía mediante la elongación y desaturación del ácido α -linolénico. Unas reacciones catalizadas por elongasas y desaturasas, respectivamente. En cambio, los PUFAs omega-6, como el 20:4n-6 (ARA), son sintetizados a partir del ácido linoleico (**Figura 6**) [26]. En la secuenciación del genoma de *Drosophila melanogaster* no se han hallado los genes que codifican para los enzimas implicados en la síntesis de PUFAs de 20C y 22C [24], pero sin embargo, en base a los datos mostrados, sí presenta la maquinaria enzimática requerida

para la conversión de DHA (22:6n-3) en EPA (20:5n-3). Además, la presencia de otros ácidos grasos de cadena más corta sugiere que *Drosophila melanogaster* también es capaz de metabolizar el ARA y EPA; sin embargo este sistema de degradación requiere más investigación.

Omega-3 fatty acids Omega-6 fatty acids

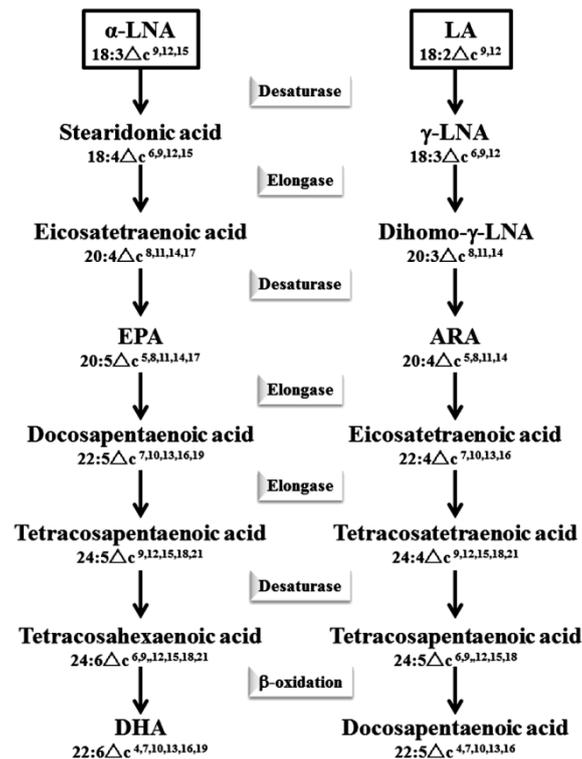


Figura 6. Síntesis de los ácidos grasos omega-3 y omega-6 en mamíferos. Los distintos ácidos grasos omega-3 y omega-6 son sintetizados mediante la elongación y desaturación de los ácidos grasos esenciales α -linolénico y linoleico, respectivamente. Las reacciones de elongación y desaturación tienen lugar en el retículo endoplasmático. La reacción final, que concluye con la síntesis del DHA omega-3 y del ácido docosapentaenoico omega-6, tiene lugar en los peroxisomas. Tomada de *Ibarguren et al.* 2014. *BBA-Biomembranes*.

Por otro lado, los 2OHFAs utilizados en el tratamiento de las moscas no fueron detectados en los cromatogramas, ni tampoco sus correspondientes ácidos grasos no hidroxilados; sin embargo, apareció un grupo de picos cromatográficos no hidroxilados que no estaban presentes en las muestras no tratadas ni en las tratadas con ácidos grasos no hidroxilados. Esto sugiere que los 2OHFAs fueron absorbidos e incorporados en el organismo de las

moscas y fueron transformados rápidamente en otros metabolitos. La ausencia de compuestos hidroxilados tras el tratamiento con 2OHFAs pone de manifiesto la capacidad de las moscas para llevar a cabo la eliminación del grupo hidroxilo de estos compuestos. Sin embargo, la ausencia de sus análogos no hidroxilados (ARA, EPA y DHA) sugiere que o bien (i) la eliminación del grupo hidroxilo se realiza por vías que no implican la síntesis de ARA, EPA o DHA, o bien que (ii) la ruta de degradación de ARA, EPA o DHA está muy activa. El uso del compuesto denominado DHAlifort, una mezcla de 2OHDHA y ácidos grasos poliinsaturados omega-3, muestra la presencia de EPA en el organismo de la mosca, lo que sugiere que la degradación de 2OHDHA se hace por una ruta independiente que no implica la síntesis de sus respectivos análogos hidroxilados. Los ácidos grasos que se generan por la metabolización de los compuestos hidroxilados representan cerca del 4% molar y se ha propuesto que pueden estar implicados en los efectos diferenciales producidos por los 2OHFAs en comparación con los FAs no hidroxilados utilizados en este estudio.

El hecho que los 2OH-FAs incrementen la supervivencia de las moscas y mejoren los resultados del *climbing test*, sugiere que los diferentes 2OHFAs analizados, o sus derivados metabólicos, pueden estar implicados en la restauración de las habilidades cognitivas y la supervivencia de los insectos. Además, la detección de estos compuestos tras analizar el perfil lipídico de las moscas proporciona una evidencia de estos efectos. Por tanto, el estudio de estos derivados lipídicos puede ser útil para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, como el Alzheimer o el Parkinson [6,7,11].

Los datos de cromatografía de gases indican la presencia de unos picos correspondientes a los los ácidos 2-hidroxioléico, 2-hidroxiolinoléico y 2-hidroxi- α -linoléico en semillas de *Salvia nilotica* y *S. viscosa*, pero no *S. officinalis* y *S. verbenaca*. Las cantidades de estos ácidos grasos hidroxilados en *S. nilotica* corresponden con las descritas en la literatura, aunque un análisis por espectrometría de masas confirmaría definitivamente su presencia. En lo que respecta a *S. viscosa*, es la primera vez que se describe la presencia de estos ácidos grasos en esta planta. Este resultado adquiere relevancia ya que la presencia del ácido 2-hidroxioléico, una molécula con carácter antitumoral, solo se había descrito anteriormente en *S. nilotica*. La extracción de compuestos hidroxilados a partir de estas plantas, o su absorción a partir de la ingesta de ellas, podría ser utilizada para el tratamiento de tumores, diabetes, obesidad, hipertensión y lesiones de la médula espinal.

Curiosamente, el término *Salvia* proviene del latín *salvus*, que significa “salud”, o *salveo*, que significa “curar”. Esta designación hace referencia a las virtudes medicinales de estas plantas [20]. Concretamente, la especie *Salvia nilotica*, la cual es originaria de Etiopía (África oriental) [27], presenta capacidades curativas frente al MICHI, una enfermedad caracterizada por fiebre, dolor de cabeza y llagas en los labios [19]. Esta característica sirvió de precedente a la hora de buscar 2OHFAs en la naturaleza debido a los numerosos efectos beneficiosos que estos presentan en el tratamiento de enfermedades.

En estudios futuros será interesante elucidar las vías de degradación de los ácidos grasos hidroxilados, así como los metabolitos resultantes para poder determinar cuál es la función que ejercen en las membranas biológicas y las vías de señalización en las que participan. Estos conocimientos permitirían conocer en mayor profundidad el mecanismo de acción de estos ácidos grasos modificados a la hora de utilizarlos en el tratamiento de las distintas enfermedades.

CONCLUSIONES

1. El modelo de Alzheimer de *Drosophila melanogaster* F1 33771 es capaz de asimilar los distintos ácidos grasos hidroxilados (2OHARA, 2OHEPA, 2OHDHA) y no hidroxilados (ARA, EPA, DHA) utilizados en el tratamiento, induciendo cambios en su perfil lipídico. Mientras que los ácidos grasos no hidroxilados pueden detectarse en el organismo de las moscas, los hidroxilados no. En su lugar se detectan una serie de metabolitos no hidroxilados que podrían estar relacionados con los efectos que tienen los 2OHFAs en la mejora de las capacidades cognitivas y aumento de la supervivencia de las moscas.
2. La presencia de 2-hidroxioléico, 2-hidroxiolinoléico y 2-hidroxi- α -linoléico en las especies vegetales *Salvia nilotica* y *Salvia viscosa* representan una fuente natural de ácidos grasos hidroxilados que podrían utilizarse en terapias para el tratamiento de enfermedades en las que se usan estos compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Valcárcel, M., & Gómez, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Ed. Reverté, S.A. (pp. 615–654).
2. Roca, P., Oliver, J., & Rodríguez, A. M. (2003). *Bioquímica: técnicas y métodos*. Ed. Hélice (pp. 112–127).
3. Voet, D., & Voet, J. G. (2006). *Bioquímica* (3ª Ed.). Ed. Médica Panamericana (pp. 397-428).
4. Devlin, T. M. (2004). *Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas* (5ª Ed.). Ed. Reverté, S.A.
5. Martínez, R., & Gragera, R. R. (2008). *Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica*. CSIC.
6. Ibarguren, M., López, D. J., Encinar, J. a., González-Ros, J. M., Busquets, X., & Escribá, P. V. (2013). Partitioning of liquid-ordered/liquid-disordered membrane microdomains induced by the fluidifying effect of 2-hydroxylated fatty acid derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(11), 2553–2563. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.014>
7. Fiol-deRoque, M. A., Gutierrez-Lanza, R., Terés, S., Torres, M., Barceló, P., Rial, R. V, ... Rodríguez, J. J. (2013). Cognitive recovery and restoration of cell proliferation in the dentate gyrus in the 5XFAD transgenic mice model of Alzheimer's disease following 2-hydroxy-DHA treatment. *Biogerontology*, 14(6), 763–75. <http://doi.org/10.1007/s10522-013-9461-4>
8. Prades, J., Alemany, R., Perona, J. S., Funari, S. S., Vögler, O., Ruiz-Gutiérrez, V., ... Barceló, F. (2008). Effects of 2-hydroxyoleic acid on the structural properties of biological and model plasma membranes. *Molecular Membrane Biology*, 25(1), 46–57. <http://doi.org/10.1080/09687680701510042>
9. A Phase 1/2A Study of Minerval in Adult Patients With Advanced Solid Tumours. (2013). Retrieved May 7, 2015, from <https://www.clinicaltrials.gov>
10. Lopez, D. H., Fiol-deRoque, M. A., Noguera-Salvà, M. A., Terés, S., Campana, F., Piotto, S., ... Busquets, X. (2013). 2-hydroxy arachidonic acid: a new non-steroidal anti-inflammatory drug. *PloS One*, 8(8), e72052. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0072052>

11. Torres, M., Price, S. L., Fiol-Deroque, M. a., Marcilla-Etxenike, A., Ahyayauch, H., Barceló-Coblijn, G., ... Escribá, P. V. (2014). Membrane lipid modifications and therapeutic effects mediated by hydroxydocosahexaenoic acid on Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(6), 1680–1692. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.12.016>
12. Vasudevan, D. ., Sreekumai, S., & Vaidyanathan, K. (2011). *Texto de Bioquímica para Estudiantes de Medicina* (6^a ed.). Cuéllar Ayala.
13. Weylandt, K. H., Chiu, C.-Y., Gomolka, B., Waechter, S. F., & Wiedenmann, B. (2012). Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 97(3-4), 73–82. <http://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.01.005>
14. Li, S., Jiang, Z., Thamm, L., & Zhou, G. (2010). 10-Hydroxy-2-decenoic Acid as an Antimicrobial Agent in Draft Keg-conditioned Wheat Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 68(2), 114–118. <http://doi.org/10.1094/ASBCJ-2010-0303-01>
15. SOUZA, J. M. M., BERKOV, S., & SANTOS, A. S. (2014). Improvement of friable callus production of *Boerhaavia paniculata* Rich and the investigation of its lipid profile by GC/MS. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 86(3), 1015–1027. <http://doi.org/10.1590/0001-3765201420130098>
16. Smith, C. R., & Wolff, I. A. (1969). Characterization of naturally occurring alpha-hydroxylinolenic acid. *Lipids*, 4(1), 9–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5766857>
17. Bohannon, M. B., & Kleiman, R. (1975). Unsaturated C18 α -hydroxy acids in *Salvia nilotica*. *Lipids*, 10(11), 703–706. <http://doi.org/10.1007/BF02532764>
18. Wollenweber, H. W., Rietschel, E. T., Hofstad, T., Weintraub, A., & Lindberg, A. A. (1980). Nature, type of linkage, quantity, and absolute configuration of (3-hydroxy) fatty acids in lipopolysaccharides from *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 and related strains. *Journal of Bacteriology*, 144(3), 898–903. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=294751&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
19. Giday, M., Asfaw, Z., Woldu, Z., & Teklehaymanot, T. (2009). Medicinal plant knowledge of the Bench ethnic group of Ethiopia: an ethnobotanical investigation.

Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 5, 34. <http://doi.org/10.1186/1746-4269-5-34>

20. Retrieved from http://es.wikipedia.org/wiki/Salvia_nilotica
21. Yoshioka, T., Inoue, H., Kasama, T., Seyama, Y., Nakashima, S., Nozawa, Y., & Hotta, Y. (1985). Evidence that arachidonic acid is deficient in phosphatidylinositol of *Drosophila* heads. *Journal of Biochemistry*, 98(3), 657–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3936840>
22. Christie, W. W. (1993). Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids for Chromatographic Analysis. *Advances in Lipid Methodology*, 69–111.
23. Alderson, N. L., Rembiesa, B. M., Walla, M. D., Bielawska, A., Bielawski, J., & Hama, H. (2004). The human FA2H gene encodes a fatty acid 2-hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 48562–8. <http://doi.org/10.1074/jbc.M406649200>
24. Shen, L. R., Lai, C. Q., Feng, X., Parnell, L. D., Wan, J. B., Wang, J. D., ... Kang, J. X. (2010). *Drosophila* lacks C20 and C22 PUFAs. *Journal of Lipid Research*, 51(10), 2985–2992. <http://doi.org/10.1194/jlr.M008524>
25. Parisi, M., Li, R., & Oliver, B. (2011). Lipid profiles of female and male *Drosophila*. *BMC Research Notes*, 4(1), 198. <http://doi.org/10.1186/1756-0500-4-198>
26. Ibarguren, M., López, D. J., & Escribá, P. V. (2014). The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838(6), 1518–28. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.12.021>
27. Hulton, P., Hpper, F. N., & Friis, I. (1991). *Luigi Balugani's Drawings of African Plants*. CRC Press. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=ctnMSWc4JdMC&pgis=1>