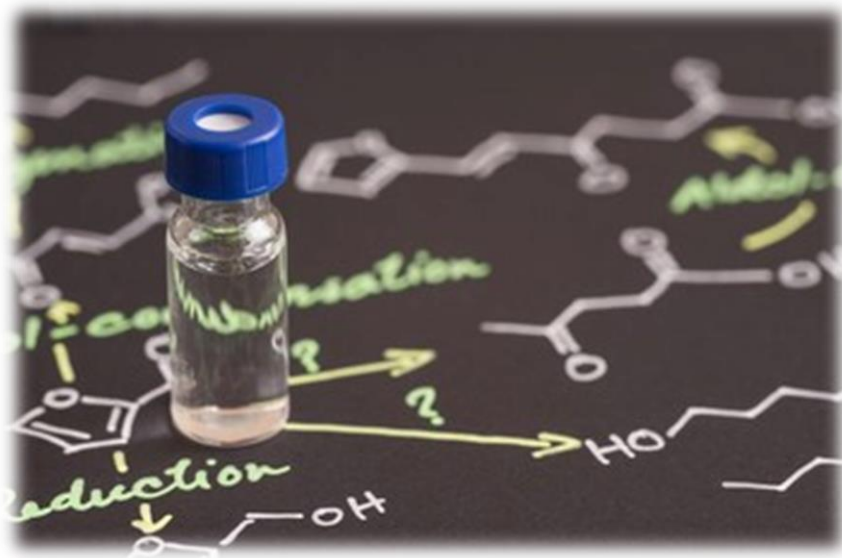




Sección de Biología  
Universidad de La Laguna

# Validación de la metodología para la detección de biomarcadores lipídicos en el sudor para las enfermedades neurodegenerativas

Validation of the methodology for the detection of lipid biomarkers in sweat for neurodegenerative disease



Trabajo de Fin de Grado

**María Paola Lorenzo Chávez**

Tutorizado por José Antonio Pérez Pérez y Nieves G. Acosta González

Grado en Biología. Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología.

Universidad de La Laguna. Julio 2023

# Índice

---

1. Resumen .....	1
2. Abstract.....	1
3. Introducción .....	3
3.1. La enfermedad de Parkinson.....	3
3.2. El sudor.....	6
3.3. Relación del sudor y piel con el Parkinson.....	7
3.4. Biomarcadores lipídicos .....	8
4. Objetivos.....	10
5. Material y Métodos .....	11
5.1. Obtención de las muestras de sudor .....	11
5.2. Preparación de las muestras de sudor.....	12
5.3. Extracción del lípido para la transmetilación indirecta (TInd).....	12
5.4. Transmetilación y purificación de FAMES.....	13
5.4.1. Transmetilación indirecta (TInd) .....	13
5.4.2. Transmetilación directa (TDir) .....	14
5.5. Cromatografía de gases .....	15
5.6. Clases lipídicas.....	15
5.7. Análisis estadístico .....	17
6. Resultados y discusión.....	18
6.1. Cromatografía de gases .....	18
6.1.1. Composición de ácidos grasos de las muestras de sudor.....	18
6.1.2. Efecto del método de recogida sobre la composición de ácidos grasos de las muestras de sudor.....	21
6.1.3. Comparación entre la transmetilación directa (TDir) y la transmetilación indirecta (TInd) para muestras de sudor recogidas con el método D o I.....	23
6.1.4. Efecto del método de recogida de la muestra de sudor en distintas áreas de la nuca.....	23
6.2. Clases lipídicas.....	23
6.2.1. Perfil de clases lipídicas de las muestras de sudor.....	23
6.2.2. Efecto del método de recogida sobre la composición de clases lipídicas de las muestras de sudor.....	25
7. Conclusiones: .....	28
8. Conclusions:.....	28
9. Bibliografía .....	29

## *1. Resumen*

En la presente memoria se pretende validar un método de obtención de muestras de sudor y poner a punto la metodología analítica de procesado con el objetivo de buscar biomarcadores lipídicos útiles en la detección temprana de enfermedades neurodegenerativas. En este caso, se ha optado por la enfermedad de Parkinson, segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en la población por detrás del Alzheimer, debido a que uno de sus síntomas está relacionado con la ausencia o producción excesiva de sudor. Tras el estudio de las muestras de sudor de 13 personas control se ha concluido que no hay diferencias entre los dos métodos de recogida de la muestra de sudor (método D, lavado de la nuca previamente con etanol y método I, sin lavar la nuca previamente con etanol) y tampoco hubo distinción en el área (zona derecha e izquierda de la nuca) de recolección de la muestra. Un tiempo de recogida de 40 minutos parece ser suficiente para poder determinar el perfil de ácidos grasos y clases lipídicas en el sudor. Las diferencias en el perfil de clases lipídicas que se encontraron en las muestras de sudor no fueron debidas al operario que recogió la muestra, sino que parecen estar relacionadas con la afección de la piel de las personas muestreadas por uno de los operarios.

**Palabras clave:** enfermedad de Parkinson, sudor, biomarcador lipídico, clases lipídicas, ácidos grasos.

## *2. Abstract*

In the present work, it is intended to validate a method for obtaining a sweat sample and fine-tune its analytical methodology with the aim of searching for useful lipid biomarkers in the early detection of neurodegenerative diseases. In this case, Parkinson's disease, the second most common neurodegenerative disease in the population after Alzheimer's disease, has been chosen because one of its symptoms is related to the absence or excessive production of sweat. After studying the sweat samples from 13 control people, it has been concluded that there was no significant differences between the two methods of collecting the sweat sample (method D, previously washing the nape with ethanol, and method I, without previously washing the nape with ethanol) and there was no difference in the sample collection area (right and left area of the nape). A collection time of 40 minutes seems to be sufficient to allow determining fatty acid and lipid classes profile of the sweat. The differences in the lipid class profile found in the sweat samples were not due to the operator who collected the sample, but rather seem to be related to the skin disorder of the people sampled by one of the operators.

**Palabras clave:** Parkinson's disease, sweat, lipid biomarker, lipid classes, fatty acids.

# **Introducción**

## **3. Introducción**

### **3.1. La enfermedad de Parkinson**

#### **3.1.1. Historia de la enfermedad de Parkinson**

James Parkinson (1755-1824) cirujano británico fue el primero en describir los síntomas de la enfermedad de Parkinson en su más destacada monografía titulada “*An essay of the shacking palsy*” (traducido al español como “Ensayo sobre la parálisis temblorosa”) que publica en 1817. A estos síntomas descritos por Parkinson, fueron ampliados con el trastorno de la rigidez por Armand Trousseau (1801-1867). Sin embargo, no fue hasta 1881 que fue introducido el término “*Maladie de Parkinson*” (traducido al español como “Enfermedad de Parkinson”, citado con las siglas EP en adelante) por el neurólogo francés Jean Martin Charcot (1825-1893). Posteriormente a Charcot, el neuropatólogo uzbeko Constantin Trétiakoff (1892-1958) en 1919 validó la hipótesis propuesta por Edorard Brissaud (1852-1909) en 1895, quien decía que en la enfermedad estaba implicada el sistema nervioso central que se respalda con la pérdida en la sustancia nigra del mesencéfalo (en el tronco encefálico) y de neuronas dopaminérgicas, y la presencia en el citoplasma de dichas células de los cuerpos de Lewy, descubiertos por el patólogo alemán Friederich Lewy (1885-1950). Más adelante, en 1956, Arvid Carlsson descubrió que la causa del Parkinson se debía a una disminución del neurotransmisor dopamina, por lo que recibió el Premio Nobel de Medicina Fisiología en el año 2000. Gracias a esto, tanto Hornikywicz y Birkmayer en 1960, como George Constantin Cotzias en 1967, encontraron que la Levodopa (L-Dopa) ya sea por vía endovenosa u oral, respectivamente, son métodos terapéuticos efectivos para la reducción de los síntomas motores de la EP <sup>[1][2]</sup>.

#### **3.1.2. Epidemiología de la enfermedad del Parkinson**

La EP es el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente después de la enfermedad del Alzheimer (que es cinco veces más frecuente) <sup>[2]</sup>. El número de afectados por la EP en la actualidad en España es de 120.000-150.000 personas, se estima que esta cifra se duplicará en 20 años y se triplicará en el año 2050. Además, cada año se diagnostican 10.000 casos nuevos de personas con dicha enfermedad <sup>[3]</sup>.

#### **3.1.3. Neuropatología**

La EP es una enfermedad neurodegenerativa lentamente progresiva, causada por la interacción compleja de los factores medioambientales y genéticos, como consecuencia de las

pérdidas de las neuronas dopaminérgicas principalmente en la sustancia nigra pars compacta, uno de los núcleos que constituyen los ganglios basales que se encuentran en el mesencéfalo en el tronco encefálico. También ocurre en otras regiones del cerebro como es el locus ceruleus, el núcleo basal de Meynert, el núcleo pedunculopontino, el núcleo del rafe, el núcleo motor dorsal del vago, la amígdala y el hipotálamo. La patología de Lewy\* no solo se limita a la sustancia nigra del mesencéfalo, sino que llega al nervio vago, los ganglios simpáticos, el sistema nervioso entérico, las glándulas salivales, la médula suprarrenal, los nervios cutáneos y el nervio ciático [4].

Estas dos neuropatologías de la EP están asociadas a los signos cardinales (la triada de trastornos motores) que son: la ralentización de los movimientos (acinesia), la rigidez y temblores en reposo. Además, los síntomas no motores son muy variados: fatiga, síntomas gastrointestinales, trastorno del sueño, intelectual, psiquiátrico, urinario, olfativo, sensorial, visual, respiratorio, piel y termorregulación, así como hipotensión ortoestática y edemas de las extremidades inferiores [2].

*\* La patología de Lewy consiste en la mutación del gen SNCA, que da como consecuencia el mal plegamiento de  $\alpha$ -sinucleína (este estado de plegamiento vuelve a estas proteínas insolubles) y se agregan para formar inclusiones intracelulares dentro del cuerpo celular (cuerpos de Lewy) y procesos de las neuronas (neuritas de Lewy).*

### 3.1.4. Etapas de la enfermedad de Parkinson.

La EP comienza antes de ser diagnosticada. Este periodo sería la fase preclínica (1 y 2) de la enfermedad, donde se da los síntomas premotores que son trastornos no motores (fatiga, pérdida del olfato, estreñimiento,..) que dura de 10 a 20 años. La fase diagnóstica (3), donde se produce la reducción de la dopamina en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, y con ello la aparición de la triada de síntomas motores. La fase “luna de miel” (4) donde los síntomas motores declinan por el tratamiento. La fase de agravamiento (5) reaparecen los trastornos motores y no motores como psiquiátricos, intelectuales, etc. Finalmente, la fase de declive (6), donde aparecen síntomas no motores de la enfermedad avanzada (demencia, pérdida de autonomía,..) [2] [4].

### 3.1.5. Factores de riesgo de la enfermedad de Parkinson.

Los factores de riesgo relacionado con el desarrollo de la EP son:

- **Edad.** El mayor factor de riesgo es la edad. El 15% de las personas con Parkinson lo tienen con menos de 50 años (Parkinson familiar, causado mayormente por el factor genético hereditario) y el 70% lo tiene con más de 56 años (Parkinson esporádico, causado por factores no genéticos hereditarios) <sup>[3]</sup>.
- **Género.** Posee un mayor factor de riesgo el hombre que la mujer, con una proporción de 1,5 <sup>[2]</sup>.
- **Origen étnico.** La prevalencia parece mayor en Europa, América del Norte y América del Sur. La incidencia varía según el origen étnico, siendo factores de riesgo las personas hispanas, seguidas de blancos no hispanos, asiáticos y raza de color <sup>[4]</sup>.
- **Genética.** Las variantes genéticas que incrementan el riesgo de padecer la enfermedad de Parkinson son: la mutación del gen SNCA (gen que codifica la proteína  $\alpha$ -sinucleína), las mutaciones del gen LRRK2 (codifica las quinasa, enzima que regula otras proteínas) y PARKN (codifica la proteína parkina, que permite sobrevivir a las neuronas si sus mitocondrias están dañadas) que son las causas más comunes de la enfermedad de Parkinson hereditaria dominante, y la mutación en GBA (que codifica  $\beta$ -glucocerebrosidasa, enzima que degrada lípidos), entre otras <sup>[4]</sup> <sup>[5]</sup>.
- **Medioambiente.** Mientras que algunos factores ambientales aumentan el riesgo de padecer EP como es la exposición a pesticidas, la vida rural, la ocupación agrícola y el consumo de agua de pozo; otros factores ambientales como el tabaquismo, el consumo de café, el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, el uso de bloqueadores de los canales de calcio y el consumo de alcohol disminuyen el riesgo <sup>[4]</sup> <sup>[5]</sup>.

Estos últimos factores ambientales que reducen los riesgos de padecer Parkinson han sido estudiados en múltiples artículos. Dos ejemplos de ello son: “Enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer: factores de riesgo ambientales” de Campdelacreu <sup>[6]</sup>, y “Enfermedad de Parkinson y factores ambientales. Un estudio caso-control” de Solís et al. <sup>[7]</sup>.

### 3.1.6. Diagnóstico clínico para la enfermedad de Parkinson

**El diagnóstico puramente clínico** se basa en la presencia de los signos cardinales que son evaluados por la Escala Unificada de Calificación de la Enfermedad de Parkinson (UPDRS, del inglés *Unified Parkinson's Disease Scale*) y por la Escala de estadio de Hoehn y Yahr <sup>[1]</sup>.

**El diagnóstico diferencial** donde se estudia el Parkinsonismo (donde están incluidas otras enfermedades neurodegenerativas con síntomas parecidos al Parkinson), el estado



depresivo severo, el temblor esencial, el síndrome neuroléptico del Parkinson, enfermedad de los cuerpos de Lewy, entre otros <sup>[4] [5]</sup>.

**Exámenes complementarios** donde se encuentra el estudio de imágenes que se centran en la dopamina como es la tomografía computarizada por emisión de fotón único transportadora de dopamina (DAT-SPECT), la tomografía por emisión de positrones de fluorodopa (F-DOPA PET), la ecografía transcraneal, imágenes por resonancia magnética (MRI), tomografía de coherencia óptica (OCT). No hay buenos biomarcadores bioquímicos en los biofluidos (como es la sangre, líquido cefalorraquídeo u orina), ni genético, pero están siendo ampliamente investigados en la actualidad <sup>[8]</sup>.

### 3.1.7. Tratamientos para la enfermedad de Parkinson

Los tratamientos actuales solo sirven para paliar los síntomas motores y no motores de la EP. Para los síntomas motores se utilizan como medicamentos Levodopa (L-Dopa), inhibidores de la monoaminoxidasa B, agonistas dopaminérgicos, medicamentos anticolinérgicos, la DuoDOPA, la apomorfina, inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa, además de la rehabilitación motora. Y para los síntomas no motores como el trastorno del sueño (somniaferos,...), psiquiátricos (antidepresivos), o digestivos (macrogol), entre otros <sup>[2] [4]</sup>.

## 3.2. El sudor

Es una secreción corporal hipotónica, inodora, incolora, de pH levemente ácido (entre 4,5 y 5,5), compuesta mayoritariamente por agua y electrolitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NH}_3$ ), y en menor cantidad por sustancias orgánicas como proteínas, lípidos, aminoácidos y urea. Estas últimas son degradadas a amoníaco, aminas, indol, derivados sulfhídricos, ácido butírico, u otras moléculas de tamaño menor y volátiles por la flora bacteriana (habitualmente bacterias grampositivas) que se encuentran en la superficie del cuerpo <sup>[9]</sup>.

El sudor está producido por cuatro tipos de glándulas, y además, por restos de la piel como el lípido epidérmico de las células del estrato córneo y granuloso.

Las **glándulas sudoríparas ecrinas** que son funcionales desde los 2-3 años de edad, se distribuyen en toda la superficie del cuerpo de forma no uniforme (el mayor número se encuentra en las palmas de las manos y las plantas de los pies) y responde a estímulos emocionales y térmicos, siendo por ello responsable de la termorregulación. Estas glándulas ecrinas producen la mayor parte del volumen del sudor y los productos (contenidos en el sudor) que secretan son principalmente agua y NaCl en la superficie de la piel <sup>[10]</sup>.

Las **glándulas sudoríparas apocrinas** que están presentes desde el nacimiento, pero su función comienza en la pubertad. Se encuentran en la axila, los senos, la cara, el cuero cabelludo y el perineo. Están involucradas en la producción de feromonas (olor corporal), aunque esta función es rudimentaria en humanos, y responde a estímulos adrenérgicos y colinérgicos. Estas glándulas apocrinas producen el sudor viscoso que es rico en lípidos, proteínas, azúcares y amoníaco, y que es secretado hacia el folículo piloso <sup>[10]</sup>.

Las **glándulas sudoríparas apoequinas**, se desarrollan entre los 8 y los 14 años y se sitúan únicamente en la región de las axilas. Tienen propiedades ecrinas y apocrinas, responden a estímulos colinérgicos más que adrenérgicos. Producen los mismos componentes del sudor que las glándulas exocrinas, que secretan en la superficie de la piel <sup>[10]</sup>.

Las **glándulas sebáceas**, se distribuyen por toda la superficie corporal (excepto las palmas de los pies y manos) y se encuentran en mayor densidad en el cuero cabelludo, la frente, la cara y el área anogenital. Están bajo control hormonal (andrógenos) y tienen función antibacteriana, antifúngica y como feromona. Son glándulas exocrinas que secretan hacia los folículos pilosos un sudor viscoso que se denomina sebo que es rico en lípidos no polares: 45% triglicéridos, 25% ésteres de cera, 12% escualeno, 10% ácidos grasos libres, 4% colesterol y ésteres de colesterol, y 2% diglicéridos. Destacar que los principales componentes del sebo, los triglicéridos, son hidrolizados a ácidos grasos libres y glicerol por la flora bacteriana <sup>[10][11]</sup>.

Además, las glándulas sebáceas humanas y el sebo que producen contienen un ácido graso exclusivo denominado ácido sapiénico (16:1 n-10), el cual en su elongación da lugar otro ácido graso único, el ácido sebácico (18:2 n-10) <sup>[11][12]</sup>.

Los **lípidos de la epidermis**. Los queratinocitos, que constituyen el estrato córneo y granuloso de la epidermis, producen una mezcla de 50% de ceramidas (proceden de la síntesis de los esfingolípidos), 15% de ácidos grasos libres y 25% colesterol <sup>[11][13]</sup>.

### ***3.3. Relación del sudor y piel con el Parkinson***

Un 30-60% de las personas que poseen la EP, padecen disfunción de la sudoración. Es un síntoma no motor, más común en la etapa preclínica, que incluye la hiperhidrosis (aumento de la sudoración) y la hipohidrosis (disminución de la sudoración). La hiperhidrosis es más común en las personas con Parkinson que la hipohidrosis <sup>[14][15]</sup>.

La hiperhidrosis afecta sobre todo a la cabeza, cuello y tronco. Esta sudoración alterada parece ocurrir en dos formas. La inervación dopaminérgica, hiperhidrosis grave o sudores

empapados, es nocturna y se relaciona con la disminución de la inervación colinérgica y con la disminución de la activación de la respuesta refleja sudomotora de las glándulas sudoríparas de la piel y, sobre todo, de las extremidades, particularmente manos y pies; y la no dopaminérgica, que da lugar a una hiperhidrosis leve, se da por glándulas sudoríparas que son estimuladas por vías simpáticas colinérgicas, adrenérgicas y noradrenérgicas <sup>[16]</sup>.

Por otro lado, las personas con Parkinson son afectadas por la dermatitis seborreica, una enfermedad crónica de la piel que afecta en un 70% al cuero cabelludo, en un 27% a los brazos y en un 1-2% a las piernas. Esta enfermedad de la piel se presenta con placas con escamas grasosas en áreas que tienen una mayor cantidad de glándulas sebáceas, y colonización de *Malassezia* (un género de levadura) que metabolizan los lípidos a ácidos grasos libres y peróxidos de hidrogeno <sup>[14][15]</sup>.

### ***3.4. Biomarcadores lipídicos***

El término biomarcador se define según la Organización de la Salud (OMS) como: “cualquier sustancia, estructura o proceso que pueda ser medido en el cuerpo o en sus productos y que influencia o predice la incidencia de un resultado clínico o de una enfermedad”. Otra definición es dada por el Instituto Nacional del Cáncer (NIH): “Molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros líquidos o tejidos del cuerpo, y cuya presencia es un signo de un proceso normal o anormal, de una afección o de una enfermedad. Un biomarcador se utiliza a veces para determinar la respuesta del cuerpo a un tratamiento para una enfermedad o afección. También se llama marcador biológico, marcador molecular y molécula distintiva”. Según estas definiciones, podemos decir que un biomarcador lipídico es cualquiera molécula lipídica que se encuentra en los biofluidos o tejidos del cuerpo, que se puede medir de forma objetiva y que predice una afección o una respuesta a un tratamiento.

Los biomarcadores lipídicos son utilizados en la actualidad en multitud de áreas de la ciencia, como ejemplo de ellas:

- Área de la geología. Ejemplo de esto es el artículo: “*Lipid biomarkers in Lake Wudalianchi record abrupt environmental changes from the volcanic eruption in 1776*” <sup>[17]</sup>.
- Área de la astrobiología. Ejemplo de esto es el artículo: “*An overview of lipid biomarkers in terrestrial extreme environments with relevance for Mars exploration*” <sup>[18]</sup>.
- Área de la fitopatología. Ejemplo de esto es el artículo: “*Discovery of lipid biomarkers between bovine colostrum and milk using UHPLC-Q-TOF-MS lipidomics*” <sup>[19]</sup>.

- Área de la ganadería. Ejemplo de esto es el artículo: “*First assessment of leaf lipids and fatty acids as biomarkers of grapevine tolerance/susceptibility to Plasmopara viticola*” [20].
- Áreas de la biología marina, medio ambiente y ecología. Ejemplo de esto son los artículos: “*Lipid biomarker production by marine phytoplankton under different nutrient and temperature regimes*” [21] y “*Muscular cholinesterase activities and lipid peroxidation levels as biomarkers in several Mediterranean marine fish species and their relationship with ecological variables*” [22].
- Área de la ciencia forense. Ejemplo de esto es el artículo: “*The use of lipids from textiles as soft-tissue biomarkers of human decomposition*” [23].

# Objetivos

## *4. Objetivos*

En base a lo anteriormente expuesto, se ha propuesto como objetivo general del presente trabajo, establecer una metodología de recogida de muestras de sudor para su empleo en la detección de la enfermedad de Parkinson, y validar la metodología analítica para la búsqueda de biomarcadores lipídicos útiles para la detección temprana de la enfermedad.

Para la consecución de este objetivo general, se abordaron como objetivos específicos los siguientes:

1. Verificar el método de recogida de las muestras de sudor propuesto por el Dr. Ricardo Borges del Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna.
2. Estudiar el perfil de ácidos grasos y las clases lipídicas de las muestras de sudor recogidas por dos metodologías diferentes: tras lavado previo de la nuca con etanol “método D”, o sin lavado previo de la nuca con etanol “método I”.
3. Proponer un perfil de ácidos grasos y clases lipídicas para el sudor humano.

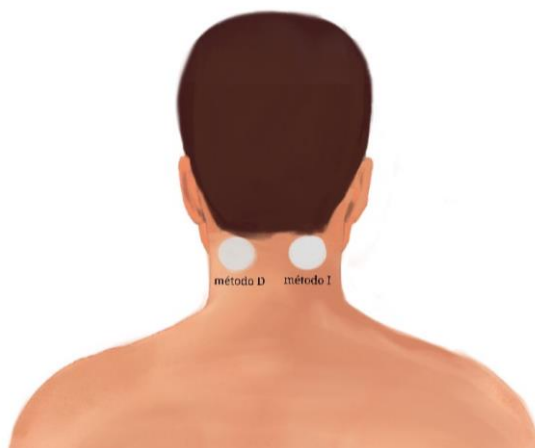
# **Material y métodos**

## 5. Material y Métodos

### 5.1. Obtención de las muestras de sudor

En este ensayo se tomaron dos muestras de sudor de 11 personas control (5 hombres de 25, 38, 39, 48 y 55 años de edad, y 6 mujeres de 22, 24, 25, 30, 38 y 64 años de edad) recogidas por el Dr. Ricardo Borges (operario 1), y de 2 personas control (una mujer de 22 años y un hombre de 57 los cuales padecen una afección en la piel de factor hereditario), recogidas por la autora de la presente memoria (operario 2).

El protocolo para la obtención de las muestras de sudor fue elaborado por el Dr. Ricardo Borges. El procedimiento para la obtención de las muestras fue el siguiente: método D, se limpió la nuca de la persona con un papel mojado en etanol antes de colocarle un filtro de microfibra de vidrio estéril (Whatman 934-AHTM); método I, se colocó el filtro de vidrio sin haber limpiado previamente la nuca con etanol (*Figura 1*). En ambos casos, se fijó el filtro Whatman en la nuca (un poco por debajo del cuero cabelludo) con un esparadrapo de papel (ya que permite separar fácilmente el filtro Whatman sin romperlo), manipulando todo con guantes estériles, y se dejó entre 40 minutos (en el caso de las muestra recogidas por la autora de la presente memoria) y 1 hora (en el caso de las muestras recogidas por el Dr. Ricardo Borges). Posteriormente, con ayuda de unas pinzas, se separó el filtro del esparadrapo, y se introdujo en un frasco de vidrio con 1 mL de dietil éter. Finalmente, se selló el frasco con su tapa y papel Parafilm®, y se le pegó una etiqueta identificativa con el código de la persona, la fecha en que se recolectó el sudor, y el sistema de recolección de muestra empleado.



**Figura 1.** Representación de la posición que debe presentar el filtro Whatman (el cual se representa con los círculos blancos) en la nuca.



Es importante destacar que una persona control (mujer de 22 años de edad del grupos personas muestreadas por el operario 2) se recolectó las dos muestras de sudor con el método D e I del lado derecho de la nuca, y que de esa misma persona se recolectó otras dos muestras con el método D e I del lado izquierdo (para poder comparar si la zona de recolección podría influir en la composición de ácidos grasos y clases lipídicas de la muestra de sudor).

### ***5.2. Preparación de las muestras de sudor***

Para las dos muestras de sudor de todas las personas control, se trasvasó el filtro Whatman y 1 mL de dietil éter del frasco de vidrio a un tubo de ensayo, y se lavó el frasco con otros 3 mL de dietil éter. Posteriormente, se evaporó el solvente en atmósfera de nitrógeno.

### ***5.3. Extracción del lípido para la transmetilación indirecta (TInd)***

Todas las determinaciones bioquímicas de las muestras de sudor fueron llevadas a cabo en los laboratorios del grupo de investigación NUTRAHLIPIDS (Fisiología de los Lípidos y sus Derivados en la Alimentación Animal y Humana, <https://portalciencia.ull.es/grupos/6273/detalle>) del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Universidad de La Laguna.

Para las dos muestras de 10 personas control recogidas por el operario 1, y de las 2 personas control recogidas por el operario 2, se llevó cabo en primer lugar la extracción del lípido para posteriormente desarrollar la transmetilación indirecta (TInd). La extracción lipídica se llevó a cabo de la siguiente manera:

Primero, siguiendo el método de Folch et al. (1957) <sup>[24]</sup> modificado por Christie y Han (2010) <sup>[25]</sup>, se usó 8 mL de mezcla cloroformo: metanol (CL: MetOH, 2:1 v/v) para lavar y trasvasar el contenido del tubo de ensayo anterior a otro nuevo tubo de ensayo. Para ello, se colocó en el nuevo tubo de ensayo un embudo, con un filtro y de esta manera se eliminó el filtro Whatman, pero habiendo extraído previamente todo el lípido con el cloroformo: metanol.

Segundo, en condiciones de frío (para evitar la oxidación de los lípidos) se añadió 2 mL de cloruro potásico (KCl, 0,88% p/v), se agitó con vórtex y se centrifugó el tubo durante 5 minutos a 1500 rpm (402  $\times$  g). Tras la centrifugación, se obtuvieron dos fases bien diferenciadas: una fase inferior de CL: MetOH donde están disueltos los lípidos, y otra fase acuosa superior de KCl, que se eliminó con la ayuda de una bomba de vacío. La fase inferior se trasvasó a un tubo limpio con una pipeta Pasteur y se evaporó el solvente en atmósfera de nitrógeno. Seguidamente, se resuspendieron y trasvasaron los lípidos con CL: MetOH a un vial

pesado previamente vacío y libre de humedad. Se evaporó de nuevo el solvente bajo atmósfera de nitrógeno y se dejó el bote en vacío y oscuridad toda la noche para eliminar restos de humedad.

Tercero, al día siguiente se pesó el vial con el lípido de la muestra y se le restó el peso del vial vacío, calculándose el lípido total de la muestra. El lípido total se resuspendió con CL: MetOH, 2:1 v/v con BHT (butilhidroxitolueno, utilizado como antioxidante) a una concentración de 10 mg/mL. Finalmente, se conservó en atmósfera de nitrógeno en el congelador a -20°C hasta realizar la TInd.

## ***5.4. Transmetilación y purificación de FAMES***

### **5.4.1. Transmetilación indirecta (TInd)**

Se trasvasó todo el lípido de la muestra de sudor a un tubo de ensayo con ayuda de una jeringa Hamilton de 10 µl, dejando únicamente 4 µl en el vial, que sería utilizado posteriormente para llevar a cabo la determinación de clases lipídicas.

A continuación, se añadió un 5% de estándar interno (19:0, ácido nonadecanoico) para poder cuantificar los ácidos grasos de la muestra de sudor, y se evaporó el solvente con nitrógeno. Tras la evaporación, se añadió 1 mL de tolueno, para facilitar la solubilidad del lípido con el reactivo que hace posible la formación de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES, del inglés *Fatty Acid Methyl Esters*), y 2 mL de ácido sulfúrico al 1% en metanol (MetOH: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, v/v). El ácido sulfúrico actúa de catalizador en la reacción de transmetilación, mientras que el metanol proporciona los grupos metilo para que se formen los FAMES.

Se agitó la mezcla con vórtex, se le añadió nitrógeno, se tapó y se mantuvo en una manta calefactora durante 18 horas a 50 °C. Tras este periodo, se dejó enfriar la mezcla y se le añadió 2 mL de bicarbonato potásico al 2% en agua (KHCO<sub>3</sub>, 2% p/v) y 5 mL de n-hexano: dietil éter 1:1 con BHT (n-Hex: Éter 1:1, v/v con 0,01% BHT). Posteriormente, se agitó con el vórtex y se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm. Se obtuvieron dos fases diferenciadas, trasvasando la fase superior que contiene los FAMES a un tubo de ensayo limpio, mientras que a la fase inferior se le añadió 5 mL de n-hexano: dietil éter sin BHT (n-Hex: Éter 1:1, v/v) con la finalidad de extraer más FAMES si quedaran. Se repitió el proceso y se trasvasó la nueva fase superior al tubo de ensayo anterior, para a continuación evaporar el solvente bajo un flujo de nitrógeno.

El extracto con los FAMES se resuspendió en 100 µL de n-hexano con una micropipeta de 20-100 µL. Seguidamente, se procedió a la purificación de los FAMES, por cromatografía

en capa fina (TLC, del inglés, *Thin Layer Chromatography*), donde la fase estacionaria es sílice sobre vidrio con una placa de 20 cm x 20 cm x 0,25 mm de espesor (Merck, Darmstadt, Alemania). Se utilizó como fase móvil una mezcla de n-hexano, dietil éter y ácido acético glacial (n-Hex: Éter: Ác. Acético, 90:10:1 v/v/v).

En cada placa se cargaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra y 50  $\mu\text{L}$  de un estándar de FAMES de huevos de bacalao con una jeringa Hamilton. Una vez cargada la placa, se introdujo en una cubeta con la fase móvil, se tapó y se esperó aproximadamente 1 hora y 20 minutos hasta su completo desarrollo. Transcurrido este tiempo, se sacó la placa de la cubeta, se dejó secar en la campana extractora de gases y se tiñó la banda del estándar con iodina (1% de yodo en cloroformo), utilizando un pulverizador con flujo de aire proporcionado por un compresor. Una vez teñida la banda, se localizaron los FAMES (aparecen como 2 bandas a modo de “hamburguesa”) y se rascó la sílice conteniendo los FAMES de las muestras de sudor sobre un trozo de papel, para posteriormente verterla en un tubo de ensayo limpio al que se añadió 8 mL de n-Hex: Éter sin BHT y 2 mL de n-Hex: Éter con BHT. Tras agitación en vórtex, se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm para obtener dos fases bien diferenciadas, la fase superior conteniendo los FAMES extraídos de la sílice por la mezcla de solventes, y la fase inferior con la sílice. La fase superior se trasvasó a un tubo de ensayo nuevo y se evaporó el solvente en presencia de nitrógeno.

Por último, se resuspendieron y trasvasaron los FAMES con 900  $\mu\text{L}$  de n-hexano a un vial con la ayuda de una pipeta de 100-1000  $\mu\text{L}$ . Como la cantidad de FAMES era muy reducida, se concentró la muestra hasta obtener un volumen final de 150  $\mu\text{L}$  de n-hexano que se introdujo en unos microviales o inserciones con capacidad de 200  $\mu\text{L}$ . El vial con la inserción se selló, etiquetó y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  bajo atmósfera de nitrógeno hasta ser inyectado en el cromatógrafo de gases.

#### **5.4.2. Transmetilación directa (TDir)**

Tras la preparación de la muestra de sudor, se realizó la Transmetilación directa (TDir) a dos muestras de una de las personas control recogida por el Dr. Ricardo Borges. La TDir se llevó a cabo evaporando el solvente con flujo de nitrógeno, añadiendo 1 mL de tolueno y 2 mL de MetOH:  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , que fueron agitados en un vórtex. A continuación, se le añadió nitrógeno, se tapó y se dejó en manta calefactora durante 18 horas a  $50^{\circ}\text{C}$ , siguiendo los mismos pasos descritos en la TInd.

### 5.5. Cromatografía de gases

Los FAMES y DMAs (que provienen de la transesterificación de los plasmalógenos) se analizaron cualitativa y cuantitativamente por cromatografía de gases (CG) mediante un TRACE GC Ultra Gas Chromatograph (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) equipado con un detector de ionización en llama (FID, del inglés *Flame Ionization Detector*) el cual utiliza el gas hidrógeno y aire, un inyector on column, y una columna capilar de sílice fundida Supelcowax™ 10 (Supelco Inc., Bellefonte, EE. UU) (30 m x 0,32 mm I.D, 0,25 µm de espesor) con fase estacionaria polar (que está bajo condiciones específicas de temperatura descritas por Galindo et al. <sup>[26]</sup>), utilizando como fase móvil el helio. Los ácidos grasos fueron identificados relacionando los tiempos de retención de los ácidos grasos de un multiestándar de composición conocida obtenido por la mezcla de FAMES de huevo de bacalao y dos estándares comerciales: FAMES c4-c24 y PUFA n°3 de Menhaden oil (Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania, USA).

Aquellos picos cuya identificación presentaba dudas como el 12:0, 16:1(n-7), 16:1(n-9), 18:1(n-7) DMA, 22:6(n-3) y 24:1(n-9), fueron identificados con un espectrómetro de masas triple cuadrupolo conectado a un cromatógrafo de gases (GS/MS Triple Quad, Agilent Technologies).

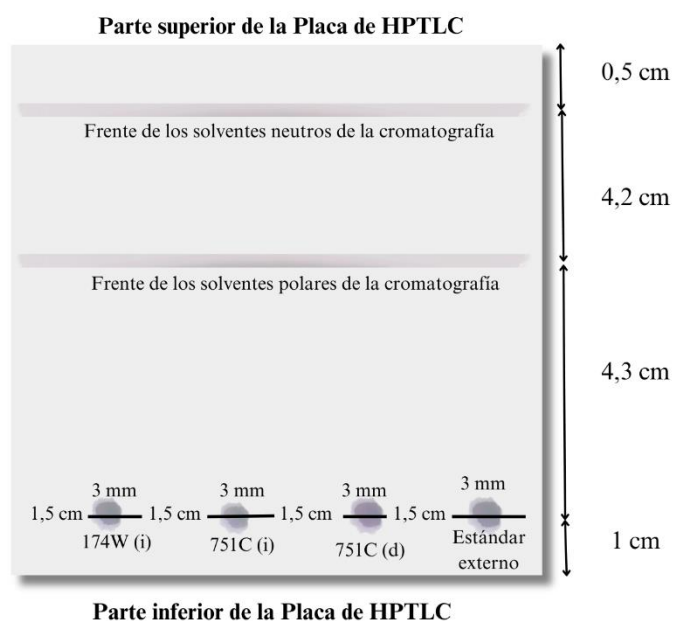
### 5.6. Clases lipídicas

Se analizó las clases lipídicas de aquellas muestras a las que se le hizo la extracción de lípido para la TInd siguiendo la metodología descrita por Olsen y Henderson <sup>[27]</sup>. Para ello se empleó 4 µL del lípido total disuelto en CL: MetOH 2:1 con BHT.

El método consistió inicialmente en lavar una placa de cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, del inglés *High Performance Thin Layer Chromatography*) de 10 cm x 10 cm con una fase estacionaria de sílice sobre vidrio, con 20 mL de dietil éter en una cubeta, para eliminar posibles impurezas. Una vez desarrollada la placa, se evaporaron los restos de solvente debajo de la campana extractora.

A continuación, se señaló la placa con lápiz blando según se muestra en la *Figura 2*, se introdujo en estufa a 110°C durante media hora para eliminar la humedad, y transcurrido ese tiempo, se introdujo en desecador. Luego se prepararon 2 mezclas de solventes que serán las 2 fases móviles para desarrollar la cromatografía unidimensional de doble desarrollo. La primera, o fase móvil polar (P), estaba compuesta por una mezcla de 5 mL de 2-propanol o isopropanol,

5 mL de cloroformo, 5 mL de metil acetato, 2 mL de metanol y 1,8 mL de cloruro de potasio (2P: CL: MA: MetOH: KCl, 5:5:5:2:1,8 v/v/v/v/v). La segunda, o fase móvil neutra (N) estaba compuesta por una mezcla de 20 mL de n-hexano, 5 mL de dietil éter y 0,5 mL de ácido acético glacial (n-Hex: Éter: Ac. Ácético, 20:5:0,5 v/v/v).



**Figura 2.** Marcado de la placa de HPTLC para clases lipídicas.

Se cargaron las placas con las muestras, usando una jeringa Halminton de 10  $\mu$ L, además de utilizar diferentes estándares externos relacionados con la posible composición lipídica de las muestras. Se ha usado, además del lípido de huevas de bacalao que contiene diversidad de clases lipídicas, lípido de cerebro de rata y de ratón, ceramidas, ceras (éster oleílico del ácido oleico). Se procedió cargando a razón de 20  $\mu$ g de muestra en 3 mm y se desarrolló la placa en el solvente polar hasta una altura de 4,3 cm, y seguidamente se secó debajo de la campana extractora antes de ser colocada en la cubeta que contenía la mezcla de solventes neutra. Se dejó desarrollar el solvente hasta una segunda marca que está a 0,5 cm de la parte superior de la placa y se puso a secar nuevamente bajo campana extractora.

Finalmente, se tiñó la placa completamente con una disolución que contiene 3% de acetato cúprico y 8% de ortofosfórico en agua destilada, para posteriormente introducirla en la estufa a 160°C durante 15-20 minutos, con la finalidad de quemar los compuestos orgánicos, que en este caso son los lípidos.

Tras la tinción, se leyó la placa en un densitómetro (TLC Scanner, CAMAG) conectado con el programa *winCats*, se identificaron las diferentes clases lipídicas de las muestras

comparándolas con los estándares presentes en la misma placa y se cuantificaron con el software *VideoScan* expresando los resultados en porcentaje de área relativa.

### ***5.7. Análisis estadístico***

Para el análisis estadístico se utilizó el software IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp., Nueva York, USA) para Windows. Primero se llevó a cabo el estudio de la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk (en caso de no normalidad los datos, éstos fueron transformados mediante el arcoseno de la raíz cuadrada, logarítmica o inversa) y la homocedasticidad de las varianzas, mediante el test de Levene. A continuación, se desarrolló una prueba T para muestras independientes para determinar si existía diferencia significativa entre los datos. En todos los test estadísticos desarrollados, el nivel de significación se fijó en  $p < 0,05$ .

# **Resultados y discusión**

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Cromatografía de gases

Debido a la reducida cantidad de lípido ( $\leq 200 \mu\text{g}$ ) y con ello, de ácidos grasos presentes en las muestras de sudor, se llevó a cabo previamente al estudio de los ácidos grasos de las muestras, una verificación de los datos cromatográficos obtenidos. El trabajar con cantidades tan pequeñas, obligó a realizar la inyección de las muestras de sudor en inserción, que tiene la finalidad de concentrar la muestra en la cromatografía de gases. Esto aumentó en mayor medida la detección de impurezas provenientes del solvente (además de las que pudiera contener el papel de filtro Whatman) que se ha utilizado para la recogida de las muestras y su posterior preparación, extracción y transmetilación directa (TDir) o indirecta (TInd) del lípido. Para ello, se aplicó a un blanco sin muestra de sudor el mismo procesado que a las muestras de sudor. Este blanco nos proporcionaría el porcentaje de impurezas presentes en las muestras debidas al proceso de recogida y preparación, y que fue descontado posteriormente del porcentaje de ácidos grasos de las muestras analizadas.

Después de la eliminación de las impurezas de los registros cromatográficos, se realizó un segundo chequeo numérico descartando aquellos ácidos grasos que se encontraban en 2 o menos de las muestras de sudor, al considerar que no serían representativos.

#### 6.1.1. Composición de ácidos grasos de las muestras de sudor.

El primer análisis que se llevó a cabo fue la comparación de los ácidos grasos de muestras de sudor recogidas por ambos operarios, aplicando el método de recogida con lavado previo de nuca con etanol (método D), o sin lavar la nuca previamente con etanol (método I) (Tabla 1).

Los resultados obtenidos demuestran que para cualquiera de los dos métodos de recogida ensayados, el operario que toma la muestra no afecta significativamente al perfil de ácidos grasos de la misma ( $p > 0,05$ ). Además, estos resultados preliminares parecen indicar que tampoco afecta los dos tiempos de recogida ensayados, ya que no se detectaron diferencias sustanciales a pesar de que el primer operario mantuvo el papel Whatman recogiendo sudor durante 1 hora, y el segundo operario mantuvo el papel Whatman recogiendo el sudor durante 40 minutos.

Únicamente se encontraron diferencias significativas en la proporción de 18:1n-9 (OLE; ácido oleico) y 20:5n-3 (EPA; ácido eicosapentaenoico) en el método D, y en los niveles de 18:1n-5, 20:5n-3 y total de n-3 LC-PUFA en el método I.



Por tanto, estas diferencias en el perfil de ácidos grasos de las muestras de sudor no se deberían al operario que recogió la muestra, sino a una diferencia en la composición del sudor de las personas muestreadas, ya que ambos operarios recogieron muestras de diferentes personas control. A pesar de las diferencias en las personas muestreadas, la composición de ácidos grasos del sudor resultó bastante estable.

**Tabla 1.** Perfil de los principales ácidos grasos (% del total de AG) de las muestras de sudor obtenidas mediante lavado de nuca previo con etanol (método D) o sin lavar la nuca previamente con etanol (método I) recogidas por diferentes operarios y analizadas por transmetilación indirecta (TInd).

Ácidos grasos	Método D		Método I	
	Operario 1	Operario 2	Operario 1	Operario 2
12:0	0,76 ± 0,44	0,49 ± 0,14	0,75 ± 0,40	0,56 ± 0,19
14:0	3,91 ± 1,39	4,11 ± 0,92	4,02 ± 1,68	6,09 ± 1,33
15:0	3,16 ± 0,87	3,24 ± 1,21	3,08 ± 1,38	3,85 ± 1,33
16:0	20,30 ± 6,95	15,11 ± 1,60	21,15 ± 6,74	17,34 ± 3,31
17:0	0,96 ± 0,41	1,04 ± 0,20	1,17 ± 0,28	1,09 ± 0,29
18:0	12,26 ± 9,16	6,50 ± 2,45	11,03 ± 10,1	3,76 ± 1,17
20:0	1,09 ± 0,90	1,24 ± 0,58	1,10 ± 0,36	0,86 ± 0,08
22:0	0,27 ± 0,36	0,59 ± 0,52	nd	nd
24:0	1,65 ± 0,65	1,95 ± 0,54	1,28 ± 0,77	1,46 ± 0,20
<b>Total SFA</b>	44,44 ± 14,4	34,28 ± 1,41	44,20 ± 14,6	35,00 ± 4,95
14:1n-5	0,64 ± 0,44	0,34 ± 0,59	0,85 ± 0,48	0,78 ± 0,69
16:1n-9	11,40 ± 4,14	7,14 ± 2,51	14,0 ± 4,82	14,00 ± 7,08
16:1 <sup>1</sup>	1,80 ± 0,34	2,52 ± 1,00	2,05 ± 0,76	3,04 ± 0,32
18:1n-9 (OLE)	11,51 ± 5,66	20,31 ± 4,86*	9,48 ± 4,44	15,1 ± 3,47
18:1n-7	1,97 ± 0,73	3,83 ± 2,84	1,62 ± 0,74	3,26 ± 1,62
18:1n-5	0,83 ± 0,58	1,69 ± 0,64	1,01 ± 0,68	1,87 ± 0,12*
20:1n-9	nd	nd	0,23 ± 0,31	0,64 ± 0,56
<b>Total MUFA</b>	31,97 ± 5,94	37,76 ± 1,41	32,94 ± 7,72	42,33 ± 5,97
16:2n-4	nd	nd	0,94 ± 0,55	0,58 ± 0,51
16:3n-4	1,88 ± 0,57	1,94 ± 0,26	2,02 ± 1,02	2,08 ± 0,74
18:2n-6 (LA)	2,78 ± 1,83	3,31 ± 1,22	1,85 ± 0,95	1,84 ± 1,67
18:3n-6	0,23 ± 0,54	0,92 ± 0,80	nd	nd
<b>Total n-6 PUFA</b>	3,01 ± 2,65	4,23 ± 2,01	1,85 ± 2,56	1,84 ± 1,78
18:4n-3	0,44 ± 0,58	0,48 ± 0,39	0,06 ± 0,15	0,09 ± 0,16
20:5n-3 (EPA)	0,13 ± 0,29	1,31 ± 0,20*	0,07 ± 0,21	0,61 ± 0,60*
<b>Total n-3 PUFA</b>	0,57 ± 1,44	1,78 ± 4,85	0,13 ± 0,74	0,70 ± 0,74
<b>Total PUFA</b>	5,42 ± 2,78	7,45 ± 2,39	4,92 ± 2,68	5,19 ± 2,50
<b>Total n-3 LCPUFA</b>	0,57 ± 1,05	1,31 ± 0,20	0,07 ± 0,21	0,61 ± 0,60*
Desconocidos	17,55 ± 5,78	21,95 ± 3,16	19,02 ± 11,5	19,53 ± 7,97

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=13, de las cuales 10 son muestras recogidas por el operario 1 y 3 son muestras recogidas por el operario 2). (\*) indica diferencia significativa entre las muestras recogidas por ambos operarios (p<0,05). <sup>1</sup>, incluye varios isómeros, principalmente n-7 y n-5; SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; nd, no detectado.

### 6.1.2. Efecto del método de recogida sobre la composición de ácidos grasos de las muestras de sudor.

La Tabla 2 muestra la comparación entre el perfil de ácidos grasos de las muestras de sudor recogidas con lavado previo de la nuca con etanol (método D) o sin lavado previo de la nuca con etanol (método I) analizadas por transmetilación indirecta (TInd).

Los resultados demuestran que no existen diferencias significativas entre los métodos empleados en la recogida de la muestra de sudor (D o I), excepto para la proporción de 20:1n-9 (0,06-0,33%) y 18:4n-3 (0,45-0,07%).

Entre los ácidos grasos saturados (SFA), los componentes más destacados fueron el ácido palmítico (16:0, 19,2-20,2%), el ácido esteárico (18:0, 10,93-9,35%) y el 14:0 (3,96-3,50%); y entre los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), el 18:1n-9 (13,54-10,80%), 16:1n-9 (10,41-14,00%) y 18:1n-7 (2,40-2,00%). Finalmente, el 18:2n-6 (LA; ácido linoleico), el 16:3n-4 (1,89-2,03%) y el 16:2n-4 (0,83-0,85%) fueron los ácidos grasos polinsaturados (PUFA) más abundantes para las muestras recogidas por el método D o por el método I, respectivamente.

Como se puede apreciar en la Tabla 2, en el sudor se encuentran representados algunos de los principales ácidos grasos en la cadena de síntesis de ácidos grasos de cadena larga como son el 16:0, el 18:0 y el 18:1n-9. También, se detectaron ciertas cantidades de LA ( $\approx 2,4\%$ ), de ácido alfa-linolénico (ALA, 18:3n-3  $\approx 0,6\%$ ) y EPA ( $\approx 0,3\%$ ), grupo de ácidos grasos omega-3 y omega-6, relevantes tanto en la formación de ecosanoides y docosanoides (participantes en la respuesta antiinflamatoria/inflamatoria) como en la composición de las membranas lipídicas, así como de interés clínico en patologías de neurodegenerativas (Zárate et al., 2017) <sup>[28]</sup>. En cambio, en las muestras de sudor no se detectó la presencia de otros ácidos grasos fisiológicamente relevantes como ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (ARA).

Por otro lado, ha resultado imposible encontrar con la espectrometría de masa dos de los ácidos grasos exclusivos de las glándulas sebáceas como se destaca en la bibliografía, el ácido selénico (16:1n-10), y el ácido sebácico (18:2n-10) <sup>[11][12]</sup>.

**Tabla 2.** Perfil de los principales ácidos grasos (% del total de AG) de las muestras de sudor recogidas con lavado de la nuca previamente con etanol (método D) o sin lavar la nuca previamente con etanol (método I) analizadas por transmetilación indirecta (TInd).

Ácidos grasos	Método D	Método I
12:0	0,70 ± 0,41	0,70 ± 0,36
14:0	3,96 ± 1,26	4,50 ± 1,80
15:0	3,18 ± 0,90	3,26 ± 1,36
16:0	19,12 ± 6,47	20,27 ± 6,22
17:0	0,98 ± 0,37	1,15 ± 0,28
18:0	10,93 ± 8,39	9,35 ± 9,33
20:0	1,12 ± 0,81	1,04 ± 0,33
22:0	0,34 ± 0,40	0,29 ± 0,35
24:0	1,72 ± 0,62	1,32 ± 0,67
<b>Total SFA</b>	<b>42,09 ± 13,27</b>	<b>42,07 ± 13,50</b>
14:1n-5	0,57 ± 0,47	0,84 ± 0,50
16:1n-9	10,41 ± 4,17	14,0 ± 5,08
16:1 <sup>1</sup>	1,96 ± 0,60	2,27 ± 0,80
18:1n-9 (OLE)	13,54 ± 6,54	10,80 ± 4,80
18:1n-7	2,40 ± 1,55	2,00 ± 1,17
18:1n-5	1,03 ± 0,68	1,21 ± 0,70
20:1n-9	0,06 ± 0,20	0,33 ± 0,39*
22:1n-9	0,36 ± 0,49	0,27 ± 0,37
<b>Total MUFA</b>	<b>33,31 ± 5,77</b>	<b>35,11 ± 8,22</b>
16:2n-4	0,83 ± 0,76	0,85 ± 0,55
16:3n-4	1,89 ± 0,50	2,03 ± 0,93
18:2n-6 (LA)	2,90 ± 1,68	1,85 ± 1,07
18:3n-6	0,39 ± 0,65	0,23 ± 0,45
20:2n-6	0,81 ± 1,34	0,76 ± 1,52
22:2n-6	0,67 ± 0,99	0,29 ± 0,64
<b>Total n-6 PUFA</b>	<b>4,77 ± 2,45</b>	<b>3,18 ± 2,34</b>
18:3n-3 (ALA)	0,58 ± 1,01	0,55 ± 0,63
18:4n-3	0,45 ± 0,53	0,07 ± 0,15*
20:5n-3 (EPA)	0,40 ± 0,58	0,19 ± 0,39
<b>Total n-3 PUFA</b>	<b>1,79 ± 1,27</b>	<b>0,81 ± 0,71</b>
<b>Total PUFA</b>	<b>9,28 ± 4,09</b>	<b>6,87 ± 3,39</b>
<b>Total n-3 LCPUFA</b>	<b>0,76 ± 0,96</b>	<b>0,19 ± 0,39</b>
<b>Total n-6 LCPUFA</b>	<b>1,47 ± 2,16</b>	<b>1,11 ± 2,12</b>
Desconocidos	18,57 ± 13,86	19,13 ± 10,54

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=13) (\*) indica diferencia significativa entre ambos métodos de recogida de muestras (p<0,05).  
<sup>1</sup>, incluye varios isómeros, principalmente n-7 y n-5; SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

### *6.1.3. Comparación entre la transmetilación directa (TDir) y la transmetilación indirecta (TInd) para muestras de sudor recogidas con el método D o I.*

Al principio de la realización de este trabajo se llevó a cabo la transmetilación directa (TDir) a dos muestras de sudor (una recogida con el método D y la otra con el método I por el operario 1) de la misma persona control, con la finalidad de compararlos posteriormente con el resto de muestras de sudor (D e I) a las que se hizo la transmetilación indirecta (TInd).

Al comparar los resultados entre las muestras con TDir y TInd tampoco se ven diferencias a simple vista, pero esto no se puede afirmar de manera concluyente, ya que no se puede analizar la normalidad, homogeneidad de la varianza y significación para una única muestra. Sería de conveniencia intentar analizar más muestras sudor con la TDir para poder llevar a cabo la comparación y con ello poder saber cuál es el mejor método de transmetilación. A pesar de ser un método más rápido y menos costoso económicamente al utilizar menor proporción de solventes, personalmente no optaría por seguir el método de transmetilación TDir, por el simple hecho de que en este proceso, el papel de filtro se desintegra mucho más que en el de TInd que es eliminado en el paso de filtrado. Además, con la TDir no se podría realizar posteriormente el análisis de las clases lipídicas, mientras que la TInd sí permite su estudio.

### *6.1.4. Efecto del método de recogida de la muestra de sudor en distintas áreas de la nuca.*

Como ya se mencionó en el apartado de Material y Métodos, a la misma persona se le recogió una muestra con el método I y otra con el método D del lado izquierdo de la nuca, y otras dos muestras (una con el método I y la otra con el método D) del lado derecho. La comparación entre ambas zonas reveló que había la misma composición y cantidad de ácidos grasos entre la muestra I del lado izquierdo de la nuca y la muestra I del lado derecho de la nuca. Lo mismo pasaba con la muestra D del lado derecho de la nuca y la otra muestra del lado izquierdo derecho de la nuca, por lo tanto, no hay diferencia alguna entre recoger la muestra de cualquier área de la nuca mientras se haga como se representa en la Figura 1.

## **6.2. Clases lipídicas**

### *6.2.1. Perfil de clases lipídicas de las muestras de sudor.*

Se llevó a cabo la comparación del perfil de clases lipídicas de las muestras de sudor recogidas por ambos operarios, aplicando el método de recogida con lavado previo de nuca con etanol (método D), o sin lavar la nuca previamente con etanol (método I) (Tabla 3).

Los resultados obtenidos evidenciaron ciertas diferencias en el perfil de clases lipídicas de las muestras de sudor obtenidas con ambas metodologías ( $p < 0,05$ ). Así por ejemplo, para el método D, la fosfatidilserina (PS), el colesterol (CHO) y los ácidos grasos libres (FFA) fueron más elevados en las muestras recogidas por el operario 1 ( $2,93 \pm 2,27$  vs  $1,02 \pm 0,80$ ;  $9,59 \pm 2,05$  vs  $6,35 \pm 2,18$ ;  $23,94 \pm 5,91$  vs  $8,38 \pm 1,92$ , respectivamente) mientras que los ésteres de colesterol/ésteres de ceras (SE) fueron más elevados en las muestras recogidas por el operario 2 ( $13,60 \pm 5,28$  y  $35,86 \pm 5,93$ , respectivamente). En el método de recogida I, la lisofosfatidilcolina (LPC) fue superior en las muestras recogidas por el operario 2 ( $0,02 \pm 0,03$  vs  $0,33 \pm 0,08$ , respectivamente), mientras que el CHO lo fue para las muestras recogidas mediante el método I ( $9,78 \pm 1,34$  vs  $7,00 \pm 2,23$ ).

Además, es interesante desatacar que, independientemente del método de recogida de la muestra, el desconocido polar 1 (UKP1) estuvo presente en todas las muestras recogidas por el operario 2 pero no fue detectado en las muestras recogidas por el operario 1.

Estas diferencias en el perfil de clases lipídicas, como se ha dicho para los ácidos grasos, no se deberían al operario 1 y 2, sino probablemente a diferencias entre las personas muestreadas, ya que el operario 1 y 2 muestrearon diferentes grupos de personas. Una posible explicación a estas notables diferencias puede ser por trastorno de piel que presentaban las dos personas muestreadas por el operario 2, coincidiendo con lo reportado por Bhattacharya et al. en 2019 [29].

Esto último es importante porque nos advierte que este tipo de estudios no se podría llevar a cabo con personas que presenten alguna afección de piel. Especial atención debe ser tenida en cuenta en pacientes con enfermedades epidérmicas relacionadas con el Parkinson como la dermatitis seborreica, hiperhidrosis o hipohidrosis [14] [15].

**Tabla 3.** Perfil de clases lipídicas (% del lípido total) de las muestras de sudor obtenidas mediante lavado de la nuca previo con etanol (método D) o sin lavar la nuca previamente con etanol (método I) recogidas por diferentes operarios.

	Método D		Método I	
	Operario 1	Operario 2	Operario 1	Operario 2
LPC	0,04 ± 0,08	0,53 ± 0,59	0,02 ± 0,03	0,33 ± 0,08*
SM	0,65 ± 0,65	0,77 ± 0,46	0,41 ± 0,37	0,68 ± 0,65
PC	6,44 ± 5,57	4,92 ± 2,70	4,72 ± 4,56	3,19 ± 0,80
PS	2,93 ± 2,27	1,02 ± 0,80*	2,38 ± 1,81	1,92 ± 1,76
PI	2,24 ± 1,55	2,12 ± 0,48	2,01 ± 1,49	1,45 ± 0,86
PG	2,97 ± 2,15	1,44 ± 0,12	2,22 ± 1,33	1,22 ± 1,81
PE	3,19 ± 1,56	3,19 ± 1,11	3,45 ± 1,45	3,14 ± 1,80
UKP1	1,74 ± 2,74	nd	0,67 ± 1,13	nd
UKP2	3,74 ± 2,03	3,17 ± 1,02	4,07 ± 1,72	4,66 ± 2,92
<b>TPL</b>	23,94 ± 12,50	17,16 ± 4,85	19,96 ± 9,68	16,60 ± 7,98
MAG/CER	13,48 ± 6,36	17,34 ± 0,98	14,00 ± 5,15	12,91 ± 1,06
DAG	5,28 ± 2,35	3,10 ± 1,02	4,74 ± 3,06	4,79 ± 2,16
CHO	9,59 ± 2,05	6,35 ± 2,18*	9,78 ± 1,34	7,00 ± 2,23*
FFA	23,94 ± 5,91	8,38 ± 1,92*	23,79 ± 5,47	20,37 ± 4,11
TAG	11,47 ± 7,10	11,81 ± 5,37	8,98 ± 3,80	10,36 ± 0,53
SE	13,60 ± 5,28	35,86 ± 5,93*	19,19 ± 8,28	27,97 ± 11,64
<b>TNL</b>	77,35 ± 12,50	82,84 ± 4,85	80,04 ± 9,68	83,40 ± 7,98

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=13, de las cuales 10 son muestras recogidas por el operario 1 y 3 son muestras recogidas por el operario 2). (\*) indica diferencia significativa entre las muestras recogidas por ambos operarios (p<0,05). LPC, lisofosfatidilcolina; SM, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; UKP1, desconocido polar uno; UKP2, desconocido polar dos; TPL, total de lípidos polares; MAG/CER, monoacilgliceroles más ceramidas; DAG, diacilgliceroles; CHO, colesterol; FFA, ácidos grasos libres; TAG, triacilgliceroles; SE, ésteres de colesterol y ésteres de ceras; TNL, total de lípidos neutros; nd, no detectado.

### 6.2.2. Efecto del método de recogida sobre la composición de clases lipídicas de las muestras de sudor.

Al comparar el perfil de clases lipídicas de las muestras de sudor recogidas por ambos operarios, aplicando el método de recogida con lavado de la nuca previamente con etanol (método D), o sin lavar la nuca previamente con etanol (método I) (Tabla 4), no se observaron diferencias significativas entre los perfiles de clases lipídicas de las muestras obtenidas por el método D o I.

Independientemente del método de recogida de la muestra, las clases lipídicas más destacadas fueron la fosfatidilcolina (PC) con un 6,09-4,37%; la fosfatiletanolamina (PE) con un 3,19-3,38% y fosfoglicéridos (PG) 2,62-1,99% entre los lípidos polares (PL). En cuanto a los lípidos neutros (NL) destacan los FFA con 20,35-23,00%; los SE con 18,73-21,22% y monoacilglicerol más ceramidas (MAG/CER) con un 14,37-13,75%.

Comparando el perfil de las clases lipídicas de las muestras de sudor obtenido en nuestro estudio con el perfil de clases lipídicas que secretan glándulas sebáceas y los lípidos de la epidermis que forman el sudor que muestra la bibliografía, se aprecia que SE (que reúne los esteres de colesterol, esteres de ceras o simplemente denominada cera y el escualeno), TAG, DAG y monoacilgliceridos (MAG) (procedente de la degradación de DAG y TAG) que se encuentran en el sudor podrían corresponder a la secreción de las glándulas sebáceas. Las CER y esfingomielina (SM) (que se degrada a CER) son producidas por las células corneas y granulosas de la epidermis <sup>[12][13]</sup>. Además, los FFA y CHO son producidos tanto por las glándulas sebáceas como por la epidermis. En las muestras de sudor también se ha encontrado lípidos polares en menor porcentaje como PE, PG, fosfatidilinositol (PI), PS, fosfatidilcolina (PC), LPC (proveniente de la degradación de PC) que podrían ser parte de los lípidos estructurales de las membranas plasmáticas de las células que se escaman de la epidermis.

Cabe destacar que los porcentajes de las diferentes clases lipídicas en las muestras de sudor no se ajustan exactamente a los valores que ofrece la bibliografía sobre el porcentaje en las glándulas sebáceas y las células de la epidermis como tal, ya que el sudor no tiene un componente estructural importante al ser un líquido corporal de desecho.



**Tabla 4.** Perfil de clases lipídicas (% de lípido) de las muestras de sudor recogidas con lavado de la nuca previamente con etanol (método D) o sin lavar la nuca previamente con etanol (método I).

Clases lipídicas	Método D			Método I		
	Media	±	Desviación estándar	Media	±	Desviación estándar
LPC	0,15	±	0,33	0,09	±	0,14
SM	0,68	±	0,60	0,47	±	0,43
PC	6,09	±	4,99	4,37	±	4,02
PS	2,49	±	2,14	2,28	±	1,74
PI	2,22	±	1,36	1,88	±	1,36
PG	2,62	±	1,98	1,99	±	1,27
PE	3,19	±	1,42	3,38	±	1,46
UKP1	1,34	±	2,50	0,51	±	1,02
UKP2	3,60	±	1,82	4,21	±	1,92
<b>TPL</b>	22,38	±	11,40	19,18	±	9,11
MAG/CER	14,37	±	5,78	13,75	±	4,51
DAG	4,78	±	5,29	4,75	±	2,79
CHO	8,84	±	2,44	9,14	±	1,92
FFA	20,35	±	8,57	23,00	±	5,24
TAG	10,55	±	6,53	9,30	±	3,35
SE	18,73	±	11,05	21,22	±	9,42
<b>TNL</b>	77,62	±	9,64	81,15	±	8,50

Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (método D, n=13; método I, n=13). LPC, lisofosfatidilcolina; SM, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; UKP1, desconocido polar uno; UKP2, desconocido polar dos; TPL, total de lípidos polares; MAG/CER, monoacilgliceroles más ceramidas; DAG, diacilgliceroles; CHO, colesterol; FFA, ácidos grasos libres; TAG, triacilgliceroles; SE, esteres de colesterol y esteres de ceras; TNL, total de lípidos neutros.

# **Conclusiones**

## ***7. Conclusiones:***

1. Para poder obtener el perfil de ácidos grasos y de clases lipídicas en muestras de sudor, puede ser suficiente un tiempo de recogida en el paciente de 40 minutos.
2. No hay diferencias en la composición lipídica de las muestras de sudor al ser recogidas con lavado previo de la nuca con etanol (método D), o sin lavar la nuca previamente con etanol (método I).
3. Por un mayor riesgo de desintegración del papel Whatman en la transmetilación directa (TDir), es mejor realizar la transmetilación indirecta (TInd) en las muestras de sudor.
4. La zona de recogida de la muestra de sudor en la nuca (derecha o izquierda) no afecta a su composición lipídica.
5. Las diferencias encontradas en las clases lipídicas de las muestras de sudor de los dos grupos poblacionales recogidas por los operarios, parecen deberse a la afección de piel del grupo muestreado por el operario 2.

## ***8. Conclusions:***

1. To obtain the fatty acid profile and lipid classes of sweat samples, a collection time of 40 minutes may be sufficient.
2. There are no differences in the lipid composition of the sweat samples when they were collected after a previous nape washing with etanol (method D), or without previously washing the nape with etanol (method I).
3. Due to a higher risk of Whatman paper disintegration in the direct transmethylation method (TDir), it is better to perform indirect transmethylation (TInd) of sweat sample.
4. The area of the nape (right or left) chosen for the sweat collection did not affect its lipid composition.
5. The differences found in the lipid classes of the sweat samples of the two population groups collected by the operators seem to be due to the skin condition of the group sampled by operator 2.

# **Bibliografía**

## 9. Bibliografía

- [1] Chávez-León, E., Ontiveros-Uribe, M. P., & Carrillo-Ruiz, J. D. 2013. La enfermedad de Parkinson: neurología para psiquiatras. *Salud Mental*, 36(4), 315-324.
- [2] Hausser-Hauw, C., & Robiliard, D. 2018. El Parkinson. *Qué sabes de*.
- [3] Péres, M. A. 2023. Día Mundial del Parkinson. *Sociedad Española de Neurología*.
- [4] Kalia, L. V., & Lang, A. E. 2015. Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 386(9996), 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- [5] Bloem, B. R., Okun, M. S., & Klein, C. 2021. Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 397(10291), 2284–2303. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00218X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00218X)
- [6] Campdelacreu, J. (2014). Enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer: factores de riesgo ambientales. *Neurología*, 29(9), 541-549.
- [7] Solís, María José G., & Araneda, Jacqueline F. (2017). Enfermedad de Parkinson y factores ambientales. Un estudio caso-control. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 55(4), 239-246. <https://dx.doi.org/10.4067/s0717-92272017000400239>
- [8] Lotankar, S., Prabhavalkar, K. S., & Bhatt, L. K. 2017. Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent advancement. *Neuroscience Bulletin*, 33(5), 585–597. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0183-5>
- [9] Garrote, A., & Bonet, R. 2005. Desodorantes y antitranspirantes: propiedades, composición y formas farmacéuticas. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 24(2), 64-69.
- [10] Baker L. B. 2019. Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature (Austin, Tex.)*, 6(3), 211–259. <https://doi.org/10.1080/23328940.2019.1632145>
- [11] Pappas A. 2009. Epidermal surface lipids. *Dermato-endocrinology*, 1(2), 72–76. <https://doi.org/10.4161/derm.1>
- [12] Cossette, C., Patel, P., Anumolu, J. R., Sivendran, S., Lee, G. J., Gravel, S., Graham, F. D., Lesimple, A., Mamer, O. A., Rokach, J. y Powell, W. S. (2008). Los neutrófilos humanos convierten el ácido graso poliinsaturado derivado del sebo El ácido sebaleico en un potente quimioatrayente de granulocitos. *La revista de química biológica*, 283(17), 11234–11243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709531200>
- [13] Breiden, B., & Sandhoff, K. 2014. The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841(3), 441–452. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2013.08.010>
- [14] Skorvanek, M., & Bhatia, K. P. 2016. The skin and Parkinson's disease: Review of clinical, diagnostic, and therapeutic issues. *Movement Disorders Clinical Practice*, 4(1), 21–31. <https://doi.org/10.1002/mdc3.12425>
- [15] Niemann, N., Billnitzer, A., & Jankovic, J. 2021. Parkinson's disease and skin. *Parkinsonism & Related Disorders*, 82, 61-76.
- [16] Reich, S. G., & Factor, S. A. (Eds.). 2019. Therapy of movement disorders: a case-based approach. *Springer International Publishing*, 348 pp.
- [17] Yao, Y., Huang, Y., Zhao, J., Wang, L., & Cheng, H. 2022. Lipid biomarkers in Lake Wudalianchi record abrupt environmental changes from the volcanic eruption in 1776. *Organic Geochemistry*, 164, 104349.

- [18] Finkel, P. L., Carrizo, D., Parro, V., & Sánchez-García, L. 2023. An Overview of lipid biomarkers in terrestrial extreme environments with relevance for Mars exploration. *Astrobiology*, 23(5), 563-604.
- [19] Cavaco, A. R., Laureano, G., Duarte, B., da Silva, J. M., Gameiro, C., Cunha, J., & Figueiredo, A. 2023. First assessment of leaf lipids and fatty acids as biomarkers of grapevine tolerance/susceptibility to *Plasmopara viticola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 101948.
- [20] Li, M., Li, Q., Song, W., Liu, Y., Zhang, X., Zheng, Y., & Yue, X. 2021. Discovery of lipid biomarkers between bovine colostrum and milk using UHPLC-Q-TOF-MS lipidomics. *International Dairy Journal*, 120, 105091.
- [21] Ding, Y., Bi, R., Sachs, J., Chen, X., Zhang, H., Li, L., & Zhao, M. 2019. Lipid biomarker production by marine phytoplankton under different nutrient and temperature regimes. *Organic Geochemistry*, 131, 34-49.
- [22] Solé, M., Baena, M., Arnau, S., Carrasson, M., Maynou, F., & Cartes, J. E. 2010. Muscular cholinesterase activities and lipid peroxidation levels as biomarkers in several Mediterranean marine fish species and their relationship with ecological variables. *Environment International*, 36(2), 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.11.008>
- [23] Collins, S., Stuart, B., & Ueland, M. 2023. The use of lipids from textiles as soft-tissue biomarkers of human decomposition. *Forensic Science International*, 343, 111547.
- [24] Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5)
- [25] Christie, W.W., Han, X., 2010. Lipid analysis: Isolation, separation, identification and lipidomic analysis. *Oily Press, an imprint of PJ Barnes & Associates, Bridgwater*.
- [26] Galindo, A., Reis, D.B., Rodríguez, I., Pérez, J.A., Abdul-Jalbar, B., Zárate, R., Nunes, N., Pinheiro De Carvalho, M.A.A., Acosta, N.G., Rodríguez, C., 2022a. Lipid characterization of 14 macroalgal species from Madeira Archipelago: Implications for animal and human nutrition. *Bot. Mar.* 65, 51–67. <https://doi.org/10.1515/bot-2021-0024>
- [27] Olsen, R.E., Henderson, R.J., 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 129, 189–197. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90056-7](https://doi.org/10.1016/0022-0981(89)90056-7)
- [28] Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N. et al. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clin. Trans. Med.* 6, 25 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0153-6>
- [29] Bhattacharya, N., Sato, W. J., Kelly, A., Ganguli-Indra, G., & Indra, A. K. 2019. Epidermal Lipids: Key Mediators of Atopic Dermatitis Pathogenesis. *Trends in molecular medicine*, 25(6), 551–562. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.04.001>