

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación
en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Estudio de biomarcadores metabólicos en la piel relacionados
con el envejecimiento en una población del noroeste de
México**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Jhordan Ojeda González

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Jhordan Ojeda González

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Aldo Moreno Ulloa
Director de tesis

Dra. Carolina Álvarez Delgado

Dr. Irvin Hussein López Nava



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Jhordan Ojeda González** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Estudio de biomarcadores metabólicos en la piel relacionados con el envejecimiento en una población del noroeste de México

Resumen aprobado por:

Dr. Aldo Moreno Ulloa
Director de tesis

La piel, siendo el órgano más grande, es fácilmente accesible para la obtención de muestras no invasivas. Esto convierte a la piel en una valiosa fuente de datos biológicos para la evaluación del estado de salud de los individuos. Sin embargo, la edad desempeña un papel central en casi todos los procesos humanos, y si no se tiene en cuenta adecuadamente, podría introducir sesgos al evaluar la condición de la piel. Por lo tanto, comprender cómo la edad afecta el metabolismo de la piel es crucial para crear perfiles del tipo y abundancia de metabolitos en diferentes etapas del desarrollo humano. Este estudio tuvo como objetivo identificar las diferencias metabólicas en la piel entre sujetos mexicanos de diferentes grupos de edad. Para lograrlo, se recolectaron muestras superficiales de piel (obtenidas mediante hisopos de algodón) de 75 pacientes con edades comprendidas entre 3 y 74 años. Los datos metabolómicos se obtuvieron a través de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS²), mientras que la identificación de metabolitos y los análisis estadísticos se realizaron utilizando programas informáticos exhaustivos y complementarios (GNPS, Sirius, MZmine, Metaboanalyst, entre otros). Después de un extenso uso de herramientas quimioinformáticas, se identificaron de manera putativa 2,193 metabolitos (peptídicos y no peptídicos) de diversas clases químicas, como ácidos carboxílicos y sus derivados, ácidos grasos, benceno y sus derivados sustituidos, compuestos organooxygenados, entre otros. Algunos metabolitos se cree que son sintetizados por bacterias. A través de un análisis de regresión logística con ajuste de covariables, identificamos varios metabolitos asociados positiva y negativamente con la edad, algunos de los cuales eran específicos para cada género. Los hallazgos de este trabajo incluyen la identificación de potenciales biomarcadores del envejecimiento como ciclo(Leu-Pro), destiobiotina, entre muchos otros, y también se proponen las principales clases químicas afectadas, como son azoles, diazinas y polipéptidos. En general, hemos contribuido a iluminar el panorama químico de la piel humana en una población mexicana, sugiriendo metabolitos que podrían funcionar potencialmente como biomarcadores de envejecimiento y enfermedades. No obstante, para validar nuestros hallazgos, se requieren estudios más amplios con grupos étnicos diversos y tamaños de muestra más grandes.

Palabras clave: Metabolómica, Espectrometría-de-masas, Quimioinformática, Envejecimiento-de-la-piel, Biomarcadores.

Abstract of the thesis presented by **Jhordan Ojeda González** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

Study of metabolic biomarkers in the skin related to aging in a population from northwest Mexico

Abstract approved by:

Dr. Aldo Moreno Ulloa
Thesis Director

The skin, being the largest organ, is readily accessible for non-invasive sampling, making it a valuable source of biological data that could facilitate the assessment of individuals health status. However, age exerts a central role in nearly all human processes, and if not appropriately accounted for, it could introduce biases when assessing skin condition. Therefore, understanding how age affects skin metabolism is crucial for creating profiles of the types and abundances of metabolites across different stages of human development. This study aimed to uncover metabolic differences in the skin among Mexican subjects of different age groups. To achieve this, surface skin samples (collected via cotton swabs) were gathered from 75 patients spanning ages 3 to 74. Metabolomic data was obtained through liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS²), while metabolite identification and statistical analyses were performed using comprehensive yet complementary software (GNPS, Sirius, MZmine, Metaboanalyst, among others). After an exhaustive use of comprehensive chemoinformatic tools, a total of 2,529 metabolites (peptidic and non-peptidic) were putatively identified covering diverse chemical classes, such as carboxylic acids and derivatives, fatty acyls, benzene and substituted derivatives, organooxygen compounds, among others. Some metabolites are thought to be synthesized by bacteria. Through logistic regression analysis and covariate adjustment, we identified several metabolites positively and negatively associated with age, some of which were gender specific. The findings of this study include the identification of potential aging biomarkers such as cyclo(Leu-Pro), dethiobiotin, among many others, and the proposal of the major affected chemical classes, including azoles, diazines, and polypeptides. Overall, we have contributed to illuminating the chemical landscape of human skin within a Mexican population, hinting at metabolites that could potentially function as aging and disease biomarkers. Nonetheless, to validate our findings, broader studies involving diverse ethnic groups and larger sample sizes are required.

Keywords: Metabolomics, Mass-Spectrometry, Chemoinformatics, Skin-aging, Biomarkers.

Dedicatoria

A mi MelyBonis, y a mis nenes, que me brindaron todo el soporte emocional que necesitaba y más. Ustedes fueron el motor principal para que yo no vacilara en dar lo mejor de mí día a día, pero también quienes constantemente me recordaron, para mi bien, que un momento de ocio con té y galletitas son necesarios para mantener el ritmo. Los quiero y amo mucho.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por brindarme la oportunidad de estudiar un posgrado con el respaldo económico de la beca de maestría: 830812.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California y al Departamento de Innovación Biomédica por brindarme un espacio en sus instalaciones.

Al Dr. Aldo Moreno Ulloa, por aceptarme bajo su mentoría y por las comodidades que me brindó en su laboratorio. Estoy seguro de que muchas de sus enseñanzas me serán muy útiles en mi vida académica y personal.

A mi comité sinodal, la Dra. Carolina Álvarez Delgado y el Dr. Irvin Hussein López Nava, por su disposición y por las observaciones pertinentes realizadas a lo largo de los avances de mi tesis. Gracias a su guía, he logrado presentar un trabajo de calidad del que me siento muy satisfecho.

A mis compañeros de laboratorio MS2: Alan, Rommel y Jorge, por su amistad y el gran apoyo que recibí de ellos al ofrecerme constantemente su guía en todos aquellos problemas que ellos enfrentaron antes que yo, lo cual facilitaron enormemente mi introducción al laboratorio. Y a mis compañeras de servicio: Lorena y Lisa, con quienes pasé una de las temporadas más divertidas y amenas del posgrado.

A las amigas que hice en la división de biología: Magdiel, Grecia, Caro. Y a los amigos que hice en CICESE fuera de la división: Wicho, Miguel, Yolo y Ricardo. Todos ellos que hicieron de esta etapa algo mucho más llevadero, ya fuera por las consultas, las pláticas en los senderos o las reuniones de juegos y café.

Al grupo de Pelicanos Viajeros de CICESE, quienes con cada sendero se fueron volviendo una parte esencial de mi rutina. El formar parte de una actividad recreativa dentro y fuera de los muros de CICESE sin duda contribuyó a que tuviera un mayor sentido de pertenencia por esta institución.

A mis hermanos, que hicieron de cada día festivo una buena razón para convivir, ponernos al día y que no se sintieran como un día más en el calendario. A mi mamá, que, aunque a veces no me guste, siempre está cuidándome como a su bebé. Y a mi papá, que por razones de distancia no pudo estar presente en esta etapa de mi vida, pero que siempre me ha apoyado y sé que puedo contar con él.

Mención especial al Dr. Massimo Gulisano, que de manera indirecta incidió en mi camino académico.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	ix
 Capítulo 1. Introducción.....	 1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Anatomía de la piel.....	1
1.1.1.1 Glándulas secretoras de la piel	2
1.1.2 Factores que influyen cambios en la piel	3
1.1.2.1 La edad como factor de cambio en la composición celular	4
1.1.3 Cambios en el metabolismo de la piel a causa del envejecimiento.....	5
1.1.4 La metabolómica: una herramienta para el estudio de alteraciones metabólicas.....	5
1.1.5 La metabolómica como aproximación de estudio en los procesos de envejecimiento	7
1.2 Justificación	8
1.3 Hipótesis.....	8
1.4 Objetivos	8
1.4.1 Objetivo general	8
1.4.2 Objetivos específicos.....	9
 Capítulo 2. Metodología.....	 10
2.1 Descripción de la población del estudio	10

2.2	Acondicionamiento de los participantes para su inclusión en el estudio	10
2.3	Obtención de las muestras.....	11
2.4	Preparación de las muestras	13
2.5	Procesamiento de las muestras por LC-MS2.....	13
2.6	Identificación de metabolitos por análisis quimioinformáticos.....	14
2.7	Cuantificación de metabolitos	18
2.8	Clases químicas representativas	18
2.9	Metabolitos diferenciados y correlacionados significativamente con la edad.....	19
2.10	Análisis de enriquecimiento químico	20
 Capítulo 3. Resultados		21
3.1	Características de la población de estudio.....	21
3.2	Características del metaboloma humano de la piel.....	21
3.3	Clases químicas diferenciadas por la edad.....	24
3.4	Potenciales metabolitos del envejecimiento en la piel.....	27
 Capítulo 4. Discusión.....		33
 Capítulo 5. Conclusiones		37
 Literatura citada		38
 Anexos		46

Lista de figuras

Figura	Página
1. Estrategia de adquisición de datos.	12
2. Estrategia de análisis de datos	20
3. Distribución de la masa molecular de todos los metabolitos detectados en la piel humana	22
4. Distribución de las clases químicas representativas de la piel humana, por archivo .MGF	23
5. Red molecular de GNPS enriquecida con clases químicas de CANOPUS y ClassyFire	23
6. Distribución de clases químicas por cohorte, por archivo .MGF	25
7. Distribución de diversidad química	26
8. Perfil de distribución de clases químicas diferenciadas significativamente entre cohortes	27
9. Gráfico de volcán que destaca los metabolitos con magnitud de cambio y significancia estadística en la piel de las personas pertenecientes a la cohorte de mayores	28
10. Potenciales biomarcadores del envejecimiento en la piel encontrados en este estudio	31
11. Análisis de enriquecimiento químico con ChemRICH	32
12. Metadatos de la población de estudio	46
13. Parámetros de Sirius utilizados para procesar datos en .MGF y .mzML	47
14. Flujo simplificado en KNIME para el procesamiento de la matriz de datos de GNPS	48
15. Flujo simplificado en KNIME para el procesamiento de la matriz de datos de Sirius	48
16. Flujo simplificado en KNIME para el cálculo de error de masa	49
17. Flujo simplificado en KNIME para la obtención de la matriz de red molecular enriquecida	49
18. Red molecular de GNPS de nodos anotados (3171), distribuidos en 100 clases químicas diferentes obtenidas de CANOPUS y ClassyFire	50
19. Comparación de resultados de clases químicas encontradas por archivo .MGF	51
20. Comparación de resultados de clases químicas por alineamiento de archivos .mzML	52
21. Distribución de clases químicas por cohorte, por alineamiento de archivos .mzML	53
22. Intervalos de confianza de las comparaciones del índice de Shannon entre hombres y mujeres jóvenes y mayores, como resultado de la prueba Tukey HSD	54

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de individuos participantes en el estudio.	10
2. Características de la población.....	21
3. Resumen de identificaciones a nivel de estructura molecular (SMILES)	21
4. Características de los grupos del estudio.....	24
5. Resumen de metabolitos correlacionados positiva y negativamente por sexo	29
6. Principales 10 metabolitos correlacionados positivamente con la edad en ambos sexos.	29
7. Principales 10 metabolitos correlacionados negativamente con la edad en ambos sexos.	30
8. Identificadores de los resultados de la plataforma GNPS.....	55
9. Comparación de resultados de anotación por la aproximación clásica (CMN) con los de la aproximación Feature-Based (FBMN)	55
10. Parámetros utilizados en MZmine para el procesamiento de datos	56
11. Masa de aductos utilizados para el cálculo de la masa teórica.	57
12. Valores del índice de Shannon para cada metaboloma, calculado con valores de abundancia.....	58
13. Valores del índice de Shannon para cada metaboloma, calculado por conteo de metabolitos únicos por clase química.....	59
14. Metadatos utilizados en la plataforma MetaboAnalyst para la creación del modelo lineal por edad ajustado por covariantes (género y batch)	60
15. Principales 10 metabolitos correlacionados positivamente con la edad en hombres.	61
16. Principales 10 metabolitos correlacionados negativamente con la edad en hombres.	62
17. Principales 10 metabolitos correlacionados positivamente con la edad en mujeres.....	63
18. Principales 10 metabolitos correlacionados negativamente con la edad en mujeres.....	64
19. Paquetes de R utilizados	65

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.1 Anatomía de la piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo, abarcando hasta 2 metros cuadrados de superficie en un adulto promedio. Sus funciones incluyen dar protección al cuerpo, regular la temperatura y sales a través del sudor, crear una capa impermeabilizante con la producción de sebo, percibir estímulos externos a través del tacto e indicar del estado de salud en general (Gilaberte et al., 2016; Mohamed & Hargest, 2022).

Está compuesta de tres capas: epidermis (la exterior), dermis (la intermedia), y la hipodermis (la más interna). La epidermis tiene un grosor promedio de 1 mm, se encuentra compuesta de tejido escamoso estratificado, que a su vez está formada por cuatro tipos de células diferentes: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. No tiene contacto directo con el suministro de sangre, lo que hace que las células de las capas más alejadas pierdan fuerza, envejeciendo y eventualmente muriendo, proceso que puede tomar de 1 hasta 2 meses (Gilaberte et al., 2016; Mohamed & Hargest, 2022).

La epidermis también se divide en 4 subcapas. En orden ascendente, de la más interna a la más superficial, son: el estrato basal, donde ocurre la mitosis de queratinocitos y se encuentran los melanocitos que protegen de la radiación UV gracias a la producción de melanina (Mohamed & Hargest, 2022); el estrato espinoso, donde las células comienzan a cambiar de forma a una más estirada debido a la pérdida de agua de los queratinocitos (Mohamed & Hargest, 2022); el estrato granuloso, donde se produce la filagrina, que a través de una proteólisis libera su contenido de aminoácidos (principalmente histidina) y otros compuestos como ácido urocánico y ácido carboxílico de pirrolidina, que ayudan a la protección de la radiación UV (Chu, 2012; Gilaberte et al., 2016; Hall & Hall, 2017); y el estrato córneo, que se compone de células anucleadas muertas y muy queratinizadas, lo que les da la capacidad de absorber una gran cantidad de agua (Hall & Hall, 2017; Mohamed & Hargest, 2022). Los queratinocitos de las subcapas más internas empujan hacia afuera a otras células para ir remplazándolas. Cuando llegan a la superficie, ya son células muertas y eventualmente se desprenden de la piel en un proceso conocido como descamación (Chu,

2012). En esta capa también se encuentran los componentes accesorios de la piel: cabello, uñas, glándulas sudoríparas y sebáceas. Gracias a los corneocitos ricos en proteínas y la matriz lipídica que las rodean, esta subcapa cuenta con una gran capacidad homeostática y de protección del cuerpo a través de características como la impermeabilidad al agua, actividad antimicrobiana, absorción química selectiva, protección a radiación UV y regulación de pH (Chu, 2012; Gilaberte et al., 2016).

La dermis se encuentra por debajo de la epidermis y es una capa bastante más gruesa, formado principalmente por fibroblastos (Chu, 2012). Su tejido conectivo contiene tres tipos de fibras: colágeno (el más predominante), que se encarga de dar soporte al tejido; elastina, que otorga elasticidad; y reticulina, que brinda estabilidad a la unión dermis-epidermis (Mohamed & Hargest, 2022). Está dividido en la región papilar, compuesta de la membrana basal y las papilas, que son proyecciones hacia la epidermis que ayudan a aumentar la fricción (Hall & Hall, 2017); y la región reticular, con capas más gruesas de colágeno, se encarga de producir la mayoría de los componentes accesorios de la piel: cabello, uñas, sebo, sudor ecrino y sudor apocrino, así como conectar todo esto a otros órganos (nervioso, linfático y sanguíneo). Además de estos componentes, también se pueden encontrar vasos linfáticos, terminales nerviosas, músculo, mastocitos y células del sistema inmune (Gilaberte et al., 2016; Mohamed & Hargest, 2022).

La hipodermis se encuentra debajo de la dermis y se compone de tejido conectivo y adiposo. Sus principales funciones son las de almacenar energía en forma de grasa y sostener todas las terminaciones nerviosas y vasos sanguíneos de la piel (Hall & Hall, 2017). Entre las moléculas relevantes que secreta están la adiponectina, una citocina que regula el metabolismo de los adipocitos; leptina, que regula la ingesta de alimentos; y estrona, hormona de la menopausia (Gilaberte et al., 2016; Kolarsick et al., 2011).

1.1.1.1 Glándulas secretoras de la piel

Entre la dermis y la epidermis, existen dos tipos de glándulas que secretan la mayoría de las sustancias del cuerpo al exterior: las sudoríparas y las sebáceas.

Hay dos tipos de glándulas sudoríparas: ecrinas y apocrinas. Las ecrinas son mucho más abundantes y están distribuidas en todo el cuerpo. Secretan sudor inoloro, del cual el 99% es agua, con pequeñas concentraciones de cloro, ácido láctico, urea y nitrógeno. Su función es la de regular la temperatura y son más abundantes en manos y pies (Losquadro, 2017; Mohamed & Hargest, 2022).

Por otro lado, las glándulas apocrinas son más grandes y se confinan en las axilas, los pezones y el área perineal. A diferencia de las glándulas ecrinas, las apocrinas secretan directamente en la unidad pilosebácea y no en la superficie de la piel (Kolarsick et al., 2011). La secreción apocrina es más densa, viscosa y blanquecina. Contiene proteínas, carbohidratos y otras sustancias (Mauro, 2012; Mohamed & Hargest, 2022). Aunque su función no está del todo comprendida, se asocia que esta secreción es la que provee olor al cuerpo por medio de las bacterias que la procesan en otros subproductos, usualmente con un olor desagradable (Losquadro, 2017; Mauro, 2012; Mohamed & Hargest, 2022).

Las glándulas sebáceas se encuentran adyacentes a los folículos pilosos y existen en mayor cantidad en el rostro y el cuero cabelludo, aunque se presentan en prácticamente todo el cuerpo con excepción de los párpados, los bordes Bermellón de los labios, las palmas de las manos y plantas de los pies (James et al., 2006; Mohamed & Hargest, 2022). Se componen de sebocitos, células que contienen abundantes gotas de un complejo lípido (triglicéridos, escualeno y ceramidas) conocido como sebo, los cuales están en lóbulos en los folículos pilosos. Este sebo protege la piel circundante de desecación y es una barrera contra las bacterias (Kolarsick et al., 2011; Losquadro, 2017).

1.1.2 Factores que influyen cambios en la piel

La dinámica de secreción influye significativamente el estado fisiológico de la piel, ya que determina principalmente qué moléculas componen su superficie. Sin embargo, pese a que estos procesos están bien definidos por las funciones que desempeñan, en realidad la piel, como muchos otros órganos, es sensible de cambio a causa de múltiples factores que no necesariamente están relacionados directamente con la piel.

Los factores que ejercen cambios en la piel pueden ser de origen endógeno o exógeno. Dentro de estos últimos, los estresores ambientales, los productos del cuidado personal y los subproductos expedidos por la microbiota que vive en la piel, son todos factores que pueden modificar el aspecto y composición de la piel (Elpa et al., 2021). Entre los factores endógenos podemos encontrar los de carácter demográfico como el sexo, el peso o la edad, de los cuales se ha reportado que este último, independientemente de ser la piel el objeto de análisis, es el mayor agente que influye cambios en individuos sanos (Auro et al., 2014; Dunn et al., 2015; Slupsky et al., 2007).

1.1.2.1 La edad como factor de cambio en la composición celular

El envejecimiento de la piel es una alteración en los procesos biológicos y fisiológicos a diferentes niveles (órgano, tejido, celular, o molecular) principalmente en la epidermis y dermis debido a un acumulamiento de células que, tras varias divisiones celulares, entran en estado de senescencia (crecimiento irreversible), lo que lleva a deteriorar paulatinamente su integridad y funcionalidad (Höhn et al., 2017; López-Otín et al., 2013; Wang & Dreesen, 2018). Existen dos teorías sobre el envejecimiento intrínseco: la pérdida programada de funcionalidad por el límite de Hayflick (acortamiento de telómeros) (Hayflick, 1965) y la acumulación de mutaciones (Viña et al., 2007); o por daño celular, como el estrés oxidativo por acumulamiento de radicales libres (ROS) (Bratic & Trifunovic, 2010), cambios hormonales como en la menopausia (Makrantonakia & Zouboulis, 2009) o el incremento del metabolismo basal (Jin, 2010). También existen factores extrínsecos, como el tabaco (Kennedy et al., 2003) y la radiación UV (fotoenvejecimiento), los cuales no solo promueven el envejecimiento celular en la piel de manera independiente, sino que usualmente también se combinan con los efectos del envejecimiento intrínseco (Fitsiou et al., 2021; Grönniger et al., 2010; Rittié & Fisher, 2015).

De los cambios provocados en la piel por el envejecimiento tenemos los visuales: la piel se vuelve áspera, seca, arrugada y con una pigmentación alterada (Giacomoni et al., 2000; Quan & Fisher, 2015). A nivel tejido, hay una pérdida de la elasticidad por la disminución de la abundancia colágeno; una desorganización de la matriz extracelular (ECM) y la elastina en la dermis, lo que reduce la superficie de contacto entre dermis y epidermis, y por lo tanto disminuye el intercambio de nutrientes hacia ésta última (Wang & Dreesen, 2018); un aumento en la inflamación (Franceschi & Campisi, 2014); reducción de la velocidad de recuperación y de la capacidad de regulación térmica e hídrica; así como una prevalencia en enfermedades, como dermatitis, infecciones o cáncer (Quan & Fisher, 2015).

Con respecto a los cambios a nivel celular, las células adquieren una forma más aplanada y se ha demostrado que existe una íntima relación entre el proceso de envejecimiento y un deterioro en el desempeño de la mitocondria. Por ejemplo, se ha visto que los queratinocitos disminuyen sus niveles de coenzima Q10 cuando envejecen, esto provoca que pasen a realizar una glucólisis anaeróbica en lugar de la vía aeróbica, así como a una acumulación de lactato y ROS que fomenta la inestabilidad genética (Bratic & Trifunovic, 2010; Prah et al., 2008). A nivel molecular, hay una pérdida de la estabilidad genómica y del potencial proliferativo, así como alteraciones en el patrón de metilación del ADN (Bormann et al., 2016; López-Otín et al., 2013). Por último, se ha observado una resistencia a las señales apoptóticas y una elevada actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -gal) (Dimri et al., 1995).

1.1.3 Cambios en el metabolismo de la piel a causa del envejecimiento

La actividad de SA- β -gal es un importante indicador de la senescencia, pero es inviable como biomarcador por lo limitante que es medir su actividad (Lee et al., 2006). Se han buscado otros biomarcadores, como proteínas relacionadas con la regulación epigenética (Vitorelli et al., 2019), disminución de lamin-B1 (Wang et al., 2017) o la activación de algunas vías como p16/pRb (Ressler et al., 2006) o p53 (Davalos et al., 2013) asociados al control del ciclo celular (Wang & Dreesen, 2018).

Algunos estudios demuestran una disminución de procolágeno, un precursor del colágeno, en células senescentes, esto a causa de la actividad creciente de metaloproteinasas en la matriz como la colagenasa intersticial (MMP-1) o la estromelisina 1 (MMP-3) (Chung et al., 2000), o también por la disminución de la expresión de factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) (Quan et al., 2010). A nivel de metabolitos, recientemente se han hecho mayores avances. Por ejemplo, una disminución de los lípidos es una señal de envejecimiento de la epidermis (Song et al., 2017).

Sin embargo, pese a todos los biomarcadores hasta ahora expuestos, un problema es que estos no son exclusivos del envejecimiento celular y pueden deberse a otros factores. La sobre expresión de p16 no solo sucede en células envejecidas, sino que también puede darse en células cancerosas o en melanocitos en etapa de diferenciación (Al Dhaybi et al., 2011; Romagosa et al., 2011), o la expresión de HMGB1, que, aunque se ha encontrado en células senescentes, también está presente cuando hay inflamación (Davalos et al., 2013). Por estas razones, y aunque se tienen descritos muchos marcadores moleculares, la carencia de modelos in vivo exitosos y sin ambigüedades es lo que promueve la búsqueda de mejores estrategias en el uso de biomarcadores de la senescencia en la piel y así entender los mecanismos específicos que delimitan este proceso (Makrantonaki et al., 2012).

1.1.4 La metabolómica: una herramienta para el estudio de alteraciones metabólicas

Las ciencias ómicas, como parte de la biología de sistemas, son una rama emergente que estudia el conjunto de datos de una misma naturaleza presentes en una muestra biológica. Entre ellas se encuentran la genómica (ADN), la transcriptómica (ARN) y la proteómica (proteínas), las cuales se centran en moléculas relacionadas con el dogma central de la biología molecular (Gonzalez-Covarrubias et al., 2022). Sin embargo, estas disciplinas no abordan el análisis de los metabolitos, productos finales del metabolismo, fundamentales para entender efectos fenotípicos ante perturbaciones en el organismo (Fukusaki, 2014).

La metabolómica es la ciencia ómica de más reciente aparición y se centra en el estudio de todos los metabolitos presentes en una muestra biológica, a lo que llamamos metaboloma (S. J. Kim et al., 2016). El estudio del metaboloma entreteje los diferentes estados fisiológicos en que se encuentra un organismo y nos puede ayudar a entender cualquier proceso biológico, incluido los cambios que experimenta la piel conforme avanza la edad. Para poder estudiar el metaboloma requerimos de al menos dos pasos: la extracción de los metabolitos y posteriormente su análisis. Para la parte de la extracción, una de las herramientas más populares en la actualidad es la cromatografía líquida (para la separación de moléculas) acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS), esto por su alta sensibilidad para la identificación de moléculas tanto en un sentido horizontal (diferentes moléculas) como vertical (abundancia) (Chaleckis et al., 2016; Gonzalez-Covarrubias et al., 2022).

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS, MS² o MS²) es una variante de la espectrometría de masas tradicional que combina dos etapas de fragmentación para proporcionar mayor especificidad en la detección de moléculas presentes en una muestra. Las moléculas que entran al espectrómetro se ionizan y posteriormente se fragmentan para dar lugar a los espectros MS¹, los cuales también cuentan con información de su abundancia relativa. De los fragmentos resultantes, algunos se seleccionan para entrar a una segunda etapa de fragmentación, cuyo resultado se conoce como MS² y la cual provee de información adicional sobre el patrón de fragmentación de una molécula, lo que resulta mucho más útil para su identificación. Ambos tipos de fragmentos son complementados con la información de masa-carga (m/z) de cada ion detectado, así como de su tiempo de retención (RT), es decir, el tiempo que tardaron en llegar al detector de masa. Este enfoque permite la identificación y cuantificación precisa de compuestos en una muestra, así como la elucidación de su estructura molecular (Smith et al., 2013; Kim et al., 2016).

Entre las aproximaciones, es posible realizar un estudio dirigido, caracterizado por la identificación selectiva de moléculas ya conocidas con el fin de confirmar su presencia en una muestra, o un estudio no dirigido, que tiene una mayor cobertura al buscar todos los metabolitos en la muestra sin distinción de su naturaleza, lo que ayuda a la identificación de nuevos compuestos en una muestra biológica (Kim et al., 2016). Sin embargo, el conjunto de datos no nos dice mucho del fenotipo si no podemos interpretar la información que el espectrómetro de masas arroja. Por ello, para la parte del análisis de datos existe la quimioinformática, definido como un conjunto de herramientas informáticas que ayudan a procesar e interpretar los datos. Entre estas herramientas se encuentra MZmine (Pluskal et al., 2010), SIRIUS (Dührkop et al., 2019) o ChemRICH (Barupal & Fiehn, 2017), que con el uso de bases de datos de metabolitos (Wishart et al., 2022), su operación en conjunto nos ayuda a identificar, cuantificar y relacionar los diferentes metabolitos para darle un sentido biológico al metaboloma.

1.1.5 La metabolómica como aproximación de estudio en los procesos de envejecimiento

El uso de herramientas de metabolómica ha resultado útil para comprender qué procesos desencadenan el envejecimiento en diferentes tejidos. Por ejemplo, al utilizar sangre como fuente biológica, se han encontrado 7 compuestos (como citrulina) mayormente presentes en gente joven, mientras que 5 (como carnosina y leucina) tienen mayor presencia en adultos mayores (Chaleckis et al., 2016). Años antes, Yu et al. (2012) reportaron 131 metabolitos relacionados con la edad en suero sanguíneo, de acuerdo con poblaciones de Alemania y Reino Unido de edades entre los 30 y 80 años. Por otro lado, en muestras de orina como muestra, Thévenot et al. (2015) estudiaron la influencia de varios demográficos y encontraron 29 metabolitos asociados exclusivamente con la edad, siendo el de mayor influencia en comparación con el sexo, IMC y etnia de los sujetos. De entre sus resultados se encuentra una regulación positiva en varios compuestos aromáticos y carbohidratos como pentosa y desoxihexosa en personas de mayor edad, esto en 189 individuos franceses entre los 20 y 60 años. Por último, más recientemente Rist et al. (2017) utilizaron los metabolitos en plasma y orina para realizar un modelo de predicción de la edad en una población alemana de 301 individuos, de entre 18 a 80 años.

Aunque estos estudios son valiosos para describir los mecanismos metabólicos relacionados con la edad, los que utilizan la piel como muestra son escasos. En este contexto, cobra especial relevancia la investigación llevada a cabo por Kuehne et al. (2017), que se destaca por combinar análisis transcriptómicos y metabolómicos en muestras de piel adquiridas por un método moderadamente invasivo. Esta se centra en una población femenina de origen asiático, separadas en dos grupos de edad: 28 mujeres de 20 a 25 años, y 54 mujeres de 55 a 66 años. En ella se evidencia una disminución de coenzima Q10 y de metabolitos de la vía de las pentosas en personas de edad avanzada, así como un aumento de los metabolitos asociados con la glucosa como hexosa y aminoácidos como citrulina, ornitina y glutamato.

Además de la falta de estudios robustos en el envejecimiento de la piel que utilizan metabolómica, otro gran obstáculo es la deficiencia de las bases de datos para identificar todos los compuestos de la piel. La HMDB 5.0 (Human Metabolome Database) (Wishart et al., 2022) es una base de datos de libre acceso que reporta hasta 253,245 metabolitos en el humano, de los cuales solo 24,368 se han detectado, el resto son metabolitos que, o no ha sido posible su detección o solo se ha predicho su estructura a través de herramientas *in silico* (<https://hmdb.ca/statistics#biospecimen-statistics>). Aunado a esta fuente, recientemente se ha creado MetaboAge DB (Bucaciuc et al., 2020), una base de datos dedicada a los

metabolitos relacionados con la edad, la cual contiene 408 metabolitos anotados, 41 de ellos encontrados en piel. Sin embargo, aún con la creación de estas herramientas, todavía resulta un reto identificar y anotar compuestos, sobre todo asociarlos con la edad y excluir los hallazgos de otros factores endógenos y exógenos que podrían influenciar también los cambios en el metaboloma.

1.2 Justificación

La piel es uno de los principales puntos de contacto e intercambio de información molecular con el medio ambiente. Dadas estas características, la evaluación de la estructura y función de la piel puede evidenciar el estado de salud aparente en el humano. Es sabido que conforme envejecemos, el riesgo de desarrollar enfermedades crónico-degenerativas aumenta. Sin embargo, poco se conoce sobre cuál es el efecto que la edad ejerce sobre el metabolismo de la piel. Por lo tanto, resulta imperativo comprender, a nivel molecular, cuáles son las diferencias metabólicas en la piel con respecto a la edad en los humanos. En este estudio pretendemos abordar esta interrogante, al emplear una aproximación metabolómica apoyada con herramientas analíticas e informáticas de última generación para dilucidar las diferencias en el perfil y abundancia de metabolitos entre sujetos de distintas edades. Los resultados de este estudio permitirán profundizar en el entendimiento de la biología molecular de la piel humana al proveer de información sobre la composición metabolómica de este órgano tomando en consideración la edad. Asimismo, el conocimiento generado en este proyecto puede potencialmente incidir en la identificación de biomarcadores (i.e., metabolitos) de envejecimiento.

1.3 Hipótesis

Existen metabolitos en la piel cuya abundancia está correlacionada con la edad de los sujetos de estudio.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Identificar potenciales biomarcadores metabólicos del envejecimiento en la piel de los sujetos de estudio.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Describir el perfil metabolómico identificado en la piel desde una perspectiva global.
2. Determinar las diferencias en la abundancia de los metabolitos identificados en la piel entre dos grupos diferenciados por edad.
3. Identificar metabolitos o biomarcadores metabólicos de la piel que estén correlacionados con la edad de los sujetos.

En este capítulo inicial, se ha delineado el contexto, los objetivos y la relevancia de la investigación, proporcionando así un marco conceptual que sienta las bases para la comprensión de la problemática abordada. El siguiente capítulo presenta la metodología que guiará el desarrollo de este estudio, la cual se diseñó estratégicamente para responder a las interrogantes planteadas en la introducción.

Nota: A partir de esta sección, las figuras numeradas de la 12 a la 22, y las tablas numeradas de la 8 a la 19, se encontrarán en el apartado de Anexos correspondiente.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Descripción de la población del estudio

El presente trabajo contempla la ejecución de un análisis descriptivo del metaboloma de la piel de sujetos sanos (i.e., sin enfermedades infecciosas y crónico-degenerativas) (Manterola et al., 2019). Dada la falta de estandarización de cohortes para el estudio del envejecimiento en la piel, y tomando como punto de referencia otros estudios afines (Slupsky et al., 2007), las cohortes para este estudio fueron delimitadas utilizando la mediana de los sujetos reclutados. Considerando esto, la estrategia de reclutamiento contempló un total de 75 sujetos sanos, radicados en la ciudad de Ensenada, Baja California, México, seccionados a su vez por 8 cohortes, distribuidos equitativamente por cada década de vida (desde los 0 a los 79 años). Cada cohorte está conformada por 5 hombres y 5 mujeres, con un total de 10 sujetos por cohorte, a excepción del grupo de 70 años, compuesto por 4 hombres y 1 mujer. Los participantes cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión enlistados en la **Tabla 1**, así como con todos los lineamientos del protocolo de reclutamiento aprobado por el Comité de Bioética del CICESE (**Anexo A**).

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de individuos participantes en el estudio.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
• De 0 a 79 años • Ambos géneros (hombre o mujer) • Firma de carta de consentimiento informado • Contestar cuestionario de metadatos	• Embarazada • Diagnóstico de enfermedades infectocontagiosas; incluyendo síntomas de resfriado o gripe. • Enfermedades autoinmunes • Cáncer • Enfermedades de la piel; dermatitis atópica, psoriasis, rosácea, eczema, etc.

2.2 Acondicionamiento de los participantes para su inclusión en el estudio

Después de la identificación de los sujetos, cada uno de ellos recibió una carta de consentimiento informado al comenzar el protocolo, misma que fue leída y firmada por cada participante para aceptar comprometerse a las indicaciones establecidas en el protocolo. Al mismo tiempo, a cada uno también se le solicitó contestar un cuestionario en el que indicara sus datos antropométricos, socioeconómicos, hábitos de consumo y su estado de salud. Tanto la carta de consentimiento informado y el cuestionario fueron requisitos indispensables para poder participar en el estudio.

A fin de homogeneizar las muestras lo mayor posible, el acondicionamiento de los participantes del estudio estuvo comprendida por dos fases: una de estabilización y otra de vigilancia. La fase de estabilización fundamenta en que todos los participantes utilizaron un mismo jabón neutro para la ducha y una crema corporal (mismos que fueron proveídos por los responsables del estudio) durante dos semanas, con el objetivo de reducir la variación de contaminantes entre muestras por el uso de diferentes productos de aseo personal. Posterior a la estabilización, se procedió con la fase de vigilancia, que consistió en solicitar a los participantes abstenerse del uso de medicamentos, cosméticos (incluido bloqueador solar, perfumes o maquillaje), productos de higiene (que no sean los proveídos anteriormente) y consumo de bebidas alcohólicas, tabaco y cualquier narcótico o sustancia psicoactiva. Durante este periodo, los participantes continuaron utilizando el jabón y la crema proveídos en la fase de estabilización. Una vez concluido el periodo total de tres semanas, la piel del participante se encontraría en condiciones para ser muestreada.

2.3 Obtención de las muestras

Para establecer el momento del día más apropiado para el muestreo, se consideró la fisiología de la piel en relación con ciclo circadiano. Se sabe que los melanocitos y queratinocitos de la superficie recuperan su vitalidad durante el periodo de descanso, por lo que es sugerible tomar las muestras recién inicia el día, cuando la piel se encuentra en su estado más saludable y estable (Matsui et al., 2016). Con el fin de minimizar posibles alteraciones en las muestras debido a la rutina diaria, se acordó visitar a los participantes entre las 7 a.m. y las 10 a.m. Asimismo, se solicitó a los participantes que no se ducharan ni utilizaran productos de higiene personal, incluyendo el jabón y la crema proveídos, en las últimas 24 horas previas al día de la toma de muestra.

La obtención de muestras de la piel se realizó mediante un método no invasivo con ayuda de un hisopo de laboratorio. Los hisopos se prepararon con una semana de anticipación a la primera recolección de muestras. El proceso de preparación consistió en colocar los hisopos dentro un frasco con una solución de EtOH 50%, la cual cubría la punta de los hisopos y se dejó reposar por 12 horas. Este proceso se realizó cuatro veces para asegurar el mayor lavado posible de los contaminantes provenientes de la producción de los hisopos. Al mismo tiempo, se prepararon microtubos con 1.5 mL de solución EtOH 50% para cada participante, donde se recolectaron posteriormente las muestras obtenidas de la piel.

Según los hallazgos del estudio de Bouslimani et al. (2015), la diversidad química muestra una marcada heterogeneidad, incluso entre sitios cercanos, lo que dificulta determinar un único sitio de muestreo que

sea representativo del metaboloma de la piel. Con el propósito de obtener una muestra lo más representativa y menos invasiva posible para los participantes, se optó por realizar una combinación de varios sitios del cuerpo mediante el uso de un único hisopo. Por lo anterior, el hisopo se pasó por cada uno de los siguientes puntos en el siguiente orden: frente, cuello (debajo de la barbilla), espalda superior (entre el dorso y el cuello), palma externa de la mano, antebrazo, brazo (bíceps), muslo y pierna (**Figura 1**). Para brazos y piernas, los puntos se tomaron en ambos lados, iniciando siempre por la extremidad derecha, lo que resulta en un total de 13 puntos de contacto.

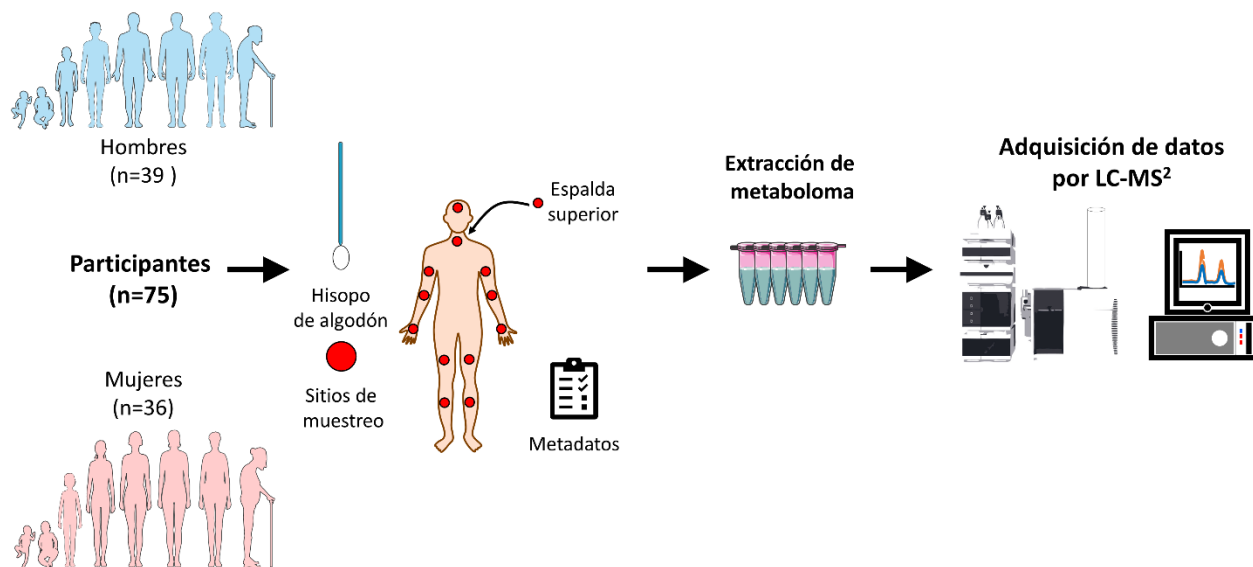


Figura 1. Estrategia de adquisición de datos.

Al momento de tomar la muestra, se tomó uno de los hisopos (ya humedecido previamente por encontrarse en el frasco con EtOH 50%) y se realizaron movimientos lineales en cada zona, con una presión uniforme y rotando el hisopo, tratando de que todo el algodón tocara la superficie de la piel. El hisopo se va secando a medida que se pasa por cada punto de contacto, así que para mitigar esto, el hisopo se introdujo nuevamente al microtubo con EtOH 50% después de tomar muestra de 3 sitios, se agitó por 20s para liberar los metabolitos extraídos hasta el momento y se continuó con el muestreo de los puntos faltantes. Al finalizar el muestreo se volvió a introducir el hisopo en el microtubo, se agitó dentro por un minuto y se exprimió el hisopo en las paredes superiores del microtubo para liberar la mayor cantidad de líquido con metabolitos dentro del microtubo. Esta solución contendría los metabolitos de la piel del participante, listo para ser procesado. Finalmente, el hisopo se desechó y el microtubo se colocó en una gradilla refrigerante para ser transportada hasta el laboratorio, donde se conservó a -80°C hasta el momento de ser procesado.

2.4 Preparación de las muestras

Se preparó una muestra control (blanco) por cada 10 muestras recolectadas, de manera que se obtuvieron un total de 8 blancos. La preparación de los blancos comprende el utilizar uno de los hisopos previamente lavados, introducirlo en un microtubo con solución EtOH 50% y revolver durante 1 minuto.

Una vez que se hubieron colectado suficientes muestras, éstas se llevaron a sequedad en un SpeedVac SRF110 (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, los sólidos que permanecieron en los tubos se suspendieron en 100 μ L de solución de cloroformo (CHCl_3) para remover el exceso de fosfolípidos. Los tubos se agitaron en vortex por 1 minuto y se centrifugaron por 10 min a 4°C y 20800 rfc en un 5417R Refrigerated Centrifuge (Eppendorf). Tras esto, se removieron 90 μ L de cloro de cada tubo, y el restante se dejó evaporar en campana de flujo laminar por 30 minutos.

La extracción de metabolitos se realizó con base en la metodología empleada por Meza-Villezcás et al. (2022) con algunas modificaciones. Después del tratamiento con cloroformo, se añadieron 500 μ L de ácido de nitrilo ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$) grado masas al 5%. Los tubos se agitaron en vortex por 1 minuto, se sonicaron por 5 minutos y se centrifugaron por 10 min a 4°C y 20800 rfc. Finalmente, se transfirió el 80% (400 μ L) del sobrenadante a nuevos microtubos estériles.

De estos últimos microtubos, se preparó una solución de control de calidad (QC, por sus siglas en inglés), combina partes iguales de todas las muestras analizadas en el estudio, con el propósito de que todos los lotes de espectrometría tengan una misma referencia y reducir el efecto batch (Liu et al., 2020). Para la preparación de este QC, se tomaron 10 μ L de cada una de las muestras. Un procedimiento similar se realizó para las muestras blancos, con lo que se obtuvo al final una única solución blanco.

Al finalizar se almacenaron todas las muestras a -80°C hasta que fueron analizados por espectrometría de masas. Además, durante todos los procedimientos de transferencia de solventes, las muestras se mantuvieron en hielo en todo momento para evitar lo mayor posible la degradación de metabolitos.

2.5 Procesamiento de las muestras por LC-MS2

Se realizaron 5 lotes de espectrometría de masas, cada una con 15 muestras, el blanco y el QC. Previo a la inyección de cada lote, se transfirieron 20 μ L de muestra y blanco, y 30 μ L de QC a su correspondiente vial

de inyección. De estos viales, se inyectaron 3 μL al cromatógrafo de líquidos Agilent 1260, con columna C18 ProtID-Chip-43 II. Se utilizó ácido fórmico (FA) al 0.1% en agua como fase móvil A y FA al 0.1% en ACN como fase móvil B. Posterior a la separación, para el análisis metabolómico las muestras pasaron por el espectrómetro de masas Agilent 6530 Q-TOF en modo positivo, con adquisición dependiente de datos (DDA) y a nivel MS/MS. El control negativo de este paso fue solución de la fase móvil A sin la muestra.

2.6 Identificación de metabolitos por análisis quimioinformáticos

El espectrómetro de masas entrega como resultado un conjunto de archivos en formato .d que contienen la información espectral de cada uno de los iones que llegan al detector de masas por cada muestra inyectada, ya sea a nivel sólo de MS1 (ionización) o también de MS2 (fragmentación). Además, cada espectro viene asociado con su respectiva masa (m/z) y tiempo de retención (RT). Esta información es, en teoría, suficiente para que algoritmos especializados puedan interpretarla y lograr describir a cada molécula con descriptores que tengan un sentido químico/biológico.

Los descriptores que se consideraron en este estudio para identificar a cada metabolito fueron principalmente estructura molecular, fórmula molecular, y los descriptores de clase química (superclase, clase y subclase). La “**librería espectral**” se refiere a una matriz de datos ordenados de estos descriptores para cada metabolito identificado, filtrada por parámetros de calidad y sin contener elementos repetidos, y representa la matriz de referencia final en el estudio. Por otro lado, la “**matriz enriquecida de red molecular**”, similar pero sin filtrar, se utiliza para enriquecer al objeto de visualización homónimo.

Dado que existe ambigüedad al utilizar el nombre o la fórmula molecular para referirse a un metabolito específico, la estructura molecular es una alternativa más precisa y libre de redundancias para identificar a una molécula. El Sistema de Notación Química de Entrada de Línea Simplificada (SMILES) es una notación química de estructura molecular que puede ser utilizado para la construcción de diagramas en 2D y 3D de la molécula (Weininger, 1988). El SMILES canónico es un identificador único de cada molécula, independientemente de sus isoformas, razón por la que fue elegido como el descriptor principal en este estudio para evitar redundancias en el análisis.

Todos los datos fueron convertidos del formato .d a .mzML con el programa MSConvert de ProteoWizard (Holman et al., 2014). El formato .mzML permite que los datos puedan ser utilizados por las herramientas de procesamiento principales para este estudio.

Para la asignación de nombre y estructura molecular, primeramente, se construyó una red molecular en la plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS). La red molecular de GNPS utiliza la información de los espectros MS2 tanto para obtener una matriz de identificación de metabolitos, como para crear una visualización del espacio químico, donde cada nodo representa un metabolito. Estos nodos se relacionan entre sí por medio de ejes, los cuales a su vez se relacionan entre sí por la similitud entre los espectros de fragmentación, aun cuando estos no tengan una anotación directa en las bases de datos, lo que permite descubrir nuevos compuestos (Wang et al., 2016).

Existen dos aproximaciones para crear una red molecular, y, por consiguiente, para obtener una matriz de identificación de metabolitos: la aproximación clásica que solo utiliza espectros MS2, CMN (Classical Molecular Networking) y una aproximación más robusta que también considera la abundancia de cada metabolito encontrada en los espectros MS1, FBMN (Feature-Based Molecular Networking). Aunque para este estudio se procesaron los datos bajo las dos aproximaciones (**Tabla 8 y 9, Anexo**), dado el mayor potencial que tiene una FBMN frente a una CMN para diferenciar particularidades en metabolomas al utilizar información cuantitativa, todos los análisis se realizaron partiendo de esta aproximación.

Para cuantificar abundancia de metabolitos, una FBMN utiliza el área bajo la curva de los espectros de MS1. Procesar y extraer esta información sólo es posible con un programa especializado, como lo es MZmine (Pluskal et al., 2010). MZmine permite generar cromatogramas de cada potencial metabolito (también conocido como *feature = m/z_RT*) para cada muestra y calcular el área bajo la curva de estos para obtener una tabla de cuantificación con la abundancia de cada feature/metabolito. Los parámetros que se utilizaron en cada uno de los subprocesos que integran el flujo de trabajo en MZmine (ver. 3.6.0.) para el procesamiento de los datos de este estudio se encuentran especificados en el **Tabla 10, Anexo**.

Los datos procesados en MZmine se exportaron a un archivo en formato .MGF (archivo espectral completo) y en una tabla de cuantificación de metabolitos para ser utilizados por la herramienta de construcción de FBMN en GNPS (Nothias et al., 2020). La red molecular se construyó con una tolerancia de 0.02 Da para masa de ion precursor y fragmento, un *Cosine Score (Min Pairs Cos / Score Threshold)* de 0.6, un mínimo de 5 iones coincidentes (*Minimum Matched Fragment Ions / Library Search Min Matched Peaks*) y se utilizaron los filtros de ventana de ion precursor y 500 Da. Los demás valores se mantuvieron por defecto. También se utilizó una hoja de metadatos con la información de adquisición y datos de cada participante (**Anexo C**).

Dado que GNPS hace una relación directa con lo reportado en bases de datos, la gran mayoría de espectros generados no tienen una coincidencia reportada, por lo que las identificaciones de GNPS, aunque de alta confianza, no suelen ser abundantes. Por esta razón, es aconsejable enriquecer la información de la red con otras herramientas de fragmentación *in silico*, como son DEREPLICATOR+ (DR) (Mohimani et al., 2018) y MolDiscovery (MD) (Cao et al., 2021). Ambas herramientas, también dentro de la plataforma de GNPS, permiten expandir la identificación de compuestos que la FBMN original otorgó. Ambas herramientas se utilizaron con una tolerancia de masa de 0.02 Da.

En paralelo al conjunto de herramientas de GNPS también se utilizó el programa Sirius (ver. 5.8.1), el cual alberga múltiples herramientas de anotación *in silico*: Sirius (homónima al nombre del programa) y ZODIAC permiten identificar y ranquear la fórmula química con el apoyo de bases de datos, respectivamente (Ludwig et al., 2020); CSI:Finger ID asigna estructura molecular con bases de datos (Dührkop et al., 2015); y CANOPUS asigna clases químicas con ayuda de ClassyFire (Dührkop et al., 2021; Feunang et al., 2016; Kim et al., 2021).

Para el análisis en Sirius, se importó el archivo .MGF proveniente de MZmine, y los valores utilizados para todas las herramientas fueron los de por defecto, con la adición de la búsqueda en las bases de datos PubChem, HMDB y KEGG, y los aductos $[M - H_2O + H]^+$, $[M + H_3N + H]$ y $[M + H_2O + H]$ (**Figura 13, Anexo**). El resultado de este análisis fueron dos matrices: una de identificación con fórmula, nombre y SMILES de cada metabolito; y una de superclase, clase y subclase química. Ambas matrices se encuentran relacionados entre sí por un mismo identificador asignado arbitrariamente a cada metabolito.

Una vez obtenidos los resultados de anotación en todas las plataformas, estos se depuraron con ayuda de la herramienta de análisis de datos KNIME (ver. 4.7.1) (Fillbrunn et al., 2017). Para la matriz de GNPS, primero se filtraron los resultados de DR y MD de acuerdo con lo sugerido por Cao et al. (2021): se tomaron sólo metabolitos con un $m/z > 400$ Da y $FDR < 5$ para DR; y se tomaron sólo metabolitos con un $m/z > 600$ Da y $FDR < 5$ para MD. Ambas matrices se unificaron con las anotaciones de GNPS, con el siguiente orden de prioridad: GNPS, MD y DR. De esta matriz, se calculó el RT en minutos, y a partir de la estructura molecular (SMILES) se encontró su clase y fórmula química a través de ClassyFire (**Anexo B**) y el nodo CIR 3:108 de KNIME (*Chemical Identifier Resolver (CIR)*, 2019), respectivamente (**Figura 14, Anexo**). Para los resultados de Sirius, se calculó el RT en minutos, se unificaron los resultados de identificación (fórmula, nombre, y estructura para cada *feature*) con la clase química de CANOPUS y se descartaron aquellos con un $m/z > 600$ Da. Por último, a las clases y subclases químicas no asignadas de ambas matrices se les colocó la etiqueta “Sin asignar” (**Figura 15, Anexo**).

Para ambas matrices, también se aplicó un filtro de error de masa experimental $< |10|$ ppm (partes por millón) con relación a la masa teórica, misma que fue calculada a partir de la fórmula química y la masa del aducto (1) (**Tabla 11, Anexo**). Para los aductos $[2M + H]^+$ y $[M + 2H]^+$, se utilizan las variantes (2) y (3), respectivamente. El error de masa se calculó con la fórmula (4). Todos aquellos metabolitos que no cumplieran con este criterio fueron descartados del análisis (**Figura 16, Anexo**).

$$Masa\ teórica = Masa\ molecular + Masa\ de\ aducto \quad (1)$$

$$Masa\ teórica\ [2M + H]^+ = 2 * Masa\ molecular + Masa\ de\ aducto \quad (2)$$

$$Masa\ teórica\ [M + 2H]^+ = \frac{Masa\ molecular}{2} + Masa\ de\ aducto \quad (3)$$

$$Error\ de\ masa\ (ppm) = \left(1 - \frac{Masa\ Teórica}{Masa\ experimental}\right) * 1000000 \quad (4)$$

Las matrices filtradas de GNPS y Sirius se unificaron en una única matriz, se removieron los duplicados de estructura química, con prioridad para los metabolitos identificados por GNPS, y finalmente se realizó una inspección manual en las bases de datos de Pubchem y ChemSpider para depurar la información. Los metabolitos que no pudieron ser encontrados se eliminaron de la matriz, lo que finalmente dio como resultado a la **librería espectral (Anexo C)**. Esta última matriz de anotación enriquecida contiene la información (anotación estructural y de clase química) de mayor confiabilidad obtenida por varias herramientas de anotación.

Por otra parte, la matriz de enriquecimiento para la red molecular fue construida al relacionar la masa y el RT (*feature*) de cada nodo de la matriz original obtenida de GNPS, con su respectivo *feature* coincidente con de la matriz de identificaciones sin filtrar (**Figura 17, Anexo**), esto con el fin de visualizar la mayor cantidad de información. Para la visualización de la red molecular, a cada nodo se le asignó la clase química más predominante de su respectivo clúster, tanto para nodos con asignación de clase química (**Figura 18, Anexo**) como únicamente nodos identificados por estructura molecular (**Figura 5**).

2.7 Cuantificación de metabolitos

La matriz de abundancia (MS1) de los metabolitos obtenida de MZmine fue normalizada por cuantiles con NormalyzerDE (Willforss et al., 2019), transformada a log10 e imputada (reemplazo de valores nulos por valores mínimos representativos) por el método random forest (Stekhoven, 2022; Stekhoven & Buehlmann, 2012) con MetImp (Wei et al., 2018) utilizando un algoritmo de R (R Core Team, 2022) interno del laboratorio (**Anexo B**). La matriz de cuantificación resultante se puede consultar en **Anexo C** como “MS1_Norm_log_MetImp”, misma que fue utilizada para todos los análisis posteriores.

2.8 Clases químicas representativas

Para visualizar las clases químicas que componen el metaboloma de la piel de todos los sujetos de estudio, se utilizó la matriz de clasificación de CANOPUS filtrada por error de masa y con eliminación de duplicados. A partir de esta lista, se contabilizó la frecuencia de cada clase química presente utilizando un script de R interno del laboratorio (**Anexo B**). Dada la gran diversidad de clases químicas encontradas, sólo se consideraron clases químicas que contuvieran por lo menos 6 metabolitos únicos (**Figura 4**).

Para poder evaluar la influencia de la edad en la distribución de clases químicas, fue necesario manejar la edad como una variable discreta, por lo que se agruparon a los sujetos en dos cohortes tomando como corte la mediana: jóvenes (37 años o menos) y mayores (38 años o más) (**Tabla 4**). Después, se contabilizó la frecuencia de cada clase química presente en cada una de las cohortes (**Figura 6**).

Para tener una noción de la diversidad de clases químicas encontradas, se calculó la diversidad de Shannon por dos métodos: utilizando el conteo de metabolitos pertenecientes a una misma clase química en cada una de las muestras (**Tabla 12, Anexo**); y utilizando la suma de abundancias de las clases químicas encontradas en cada muestra (**Tabla 13, Anexo**). Del resultado que considera la abundancia, se agrupó la distribución de la diversidad de Shannon bajo 3 criterios: 1) por sexo biológico (**Figura 7a**) con prueba t; 2) por edad (**Figura 7b**) con prueba T de Welch; 3) y por cohorte (sexo y edad) con prueba ANOVA y prueba Tukey HSD a posteriori (**Figura 7c**). Para todos los casos, se realizó una prueba de Shapiro para confirmar que la distribución fuera normal, seguido de una prueba F o de Bartlett para confirmar si las varianzas eran homogéneas. Por último, utilizando la suma de la abundancia normalizada e imputada de cada metabolito en cada sujeto, se calculó si existía una diferencia significativa entre las cohortes por cada clase química (**Figura 8**). Ambos resultados se obtuvieron con ayuda de un script de R interno del laboratorio (**Anexo B**).

2.9 Metabolitos diferenciados y correlacionados significativamente con la edad

Como búsqueda inicial de potenciales biomarcadores, se continuó con la separación de los sujetos por cohortes para encontrar metabolitos que difieren significativamente en abundancia entre ambos grupos a mediante un análisis univariante. Se calculó la media de abundancia de las cohortes y se calculó la razón de cambio (fold change, FC) con la fórmula (5). El valor de p fue calculado con una prueba t. Para discernir la razón de cambio, se establecieron como umbrales un valor de $p < 0.05$ y un valor de $FC \Rightarrow 0.585$ o $FC < -0.585$ para regulación positiva y negativa, respectivamente (**Anexo B**). Los metabolitos que no cumplieran con estos criterios se consideraron como metabolitos que no presentan cambios significativos entre los grupos de edad (**Figura 9**). La matriz resultante se empató con la librería espectral para identificar los metabolitos diferenciados significativamente en la cohorte de mayores (**Anexo C**).

$$FC = \log_2 \left(\frac{\text{Media de abundancia de metabolitos en jóvenes}}{\text{Media de abundancia de metabolitos en mayores}} \right) \quad (5)$$

Para complementar los hallazgos, y dado que la anterior aproximación podría estar sesgada por la definición de las cohortes, se procedió a realizar un análisis bivalente de correlación con la edad como variable continua. Para ello, la matriz de abundancia normalizada e imputada fue importada en la plataforma Metaboanalyst <https://metaboanalyst.ca> (Pang et al., 2021), con la cual se realizó un análisis estadístico con la información de edad como variable principal, y género y batch como covariantes (**Tabla 14, Anexo**). Dado que la tabla ya estaba normalizada e imputada por herramientas externas, no se realizó ninguna transformación a la matriz de las opciones ofrecidas por MetaboAnalyst. De este proceso, se realizó un análisis univariante por modelo lineal (limma) con ajuste de covariables (género y batch) para encontrar cuales metabolitos (por su abundancia) se correlacionaban significativamente con la edad. La matriz resultante de este modelo fue exportada y emparejada con la librería espectral (**Anexo C**) para obtener una tabla de correlación positiva (**Tabla 6**) y negativa (**Tabla 7**) con anotación final. Este mismo proceso se repitió con metabolitos exclusivos para hombres (**Tabla 15 y 16, Anexo**) y mujeres (**Tabla 17 y 18, Anexo**). Para reducir los candidatos a ser potenciales biomarcadores del envejecimiento presentes en ambos sexos, se descartaron posibles contaminantes provenientes de cosméticos y se tomaron los 10 metabolitos con menor valor p y mayor pendiente, tanto para correlación positiva y negativa. Finalmente, se realizó una inspección manual de cada uno, se seleccionaron metabolitos con pocos valores imputados y se hizo una revisión bibliográfica de esta lista, hasta encontrar metabolitos de interés biológico. Los metabolitos que pasaron este escrutinio manual se encuentran descritos en la **Figura 10**.

2.10 Análisis de enriquecimiento químico

Finalmente, con el propósito de tener un panorama más amplio de las vías metabólicas afectadas por el proceso de envejecimiento, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento químico con la herramienta web ChemRICH <https://chemrich.fiehnlab.ucdavis.edu> (Barupal & Fiehn, 2017). Dado el gran número de metabolitos encontrados en el estudio, interpretar qué implicaciones biológicas tienen los cambios encontrados es una tarea complicada. Con la finalidad de simplificar esto, ChemRICH realiza un análisis estadístico basado en la similitud química entre metabolitos para mapear posibles vías de cambio metabólico a nivel clase química. Para ello, se tomaron los metabolitos correlacionados significativamente encontrados en Metaboanalyst y se utilizó el valor de FC calculado previamente (**Figura 11**). El flujo simplificado para obtener este resultado final se describe en la **Figura 2**.

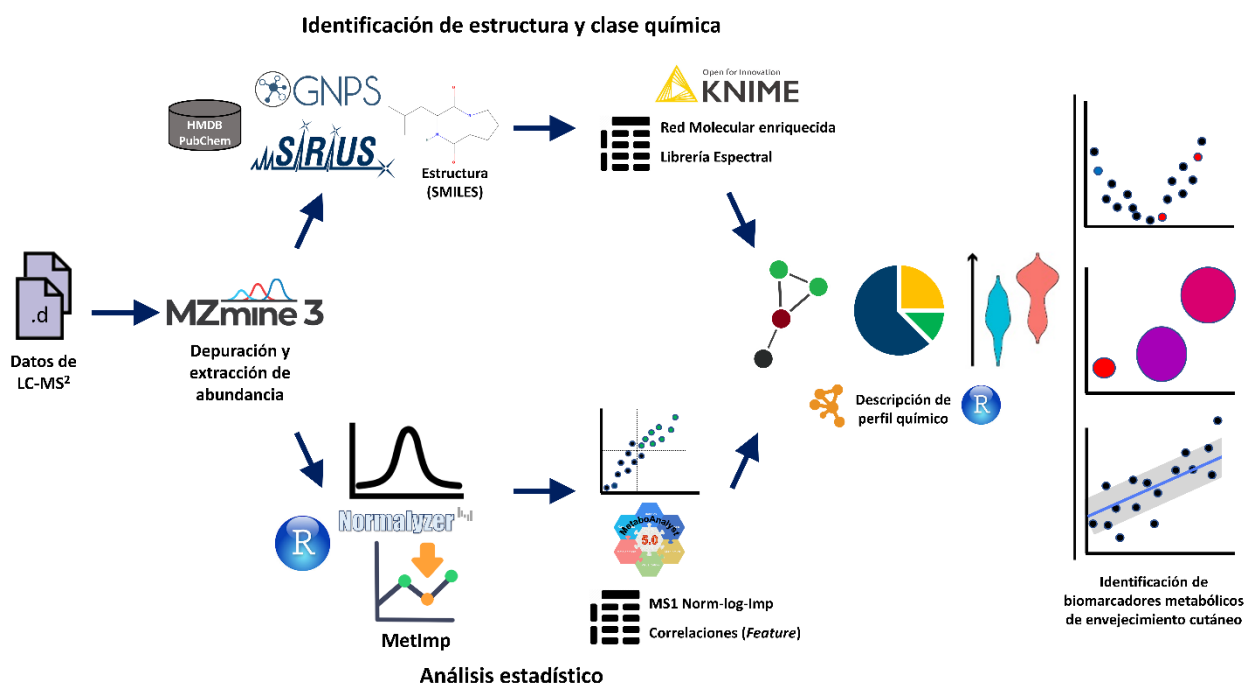


Figura 2. Estrategia de análisis de datos

En la **Tabla 19, Anexo** se enlistan todos los paquetes de R utilizados para la generación los resultados descritos en esta sección.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Características de la población de estudio

Las características de los 75 participantes de este estudio se resumen en la **Tabla 2**. La mayoría de la población de estudio tiene un peso normal, no consume tabaco, no tiene comorbilidades, lleva una dieta omnívora y han vivido la mayor parte de su vida en la ciudad de Ensenada. Hay una proporción similar de hombres y mujeres, así como de personas que consumen alcohol de las que no (**Figura 12, Anexo**).

Tabla 2. Características de la población de estudio. Los valores que se reportan para altura, peso e IMC son la media de cada grupo. H: Hombres, M: Mujeres.

Rango de edad	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	TOTAL
Participantes	H: 5 M: 5	H: 5 M: 5	H: 5 M: 5	H: 5 M: 5	H: 5 M: 5	H: 5 M: 5	H: 5 M: 5	H: 4 M: 1	H: 39 M: 36
Altura (m)	1.31	1.67	1.68	1.72	1.65	1.65	1.66	1.72	1.63
Peso (kg)	33.59	69.25	66.20	73.95	68.00	75.95	72.50	76.04	66.94
IMC (kg/m ²)	18.51	24.69	23.17	25.06	24.98	27.43	26.20	26.05	24.51

3.2 Características del metaboloma humano de la piel

Los resultados de identificación inicialmente obtenidos por GNPS arrojaron un total de 226 metabolitos identificados en bases de datos. Estos fueron enriquecidos con MolDiscovery, DEREPLICATOR+ y Sirius, en ese orden de prioridad. La librería espectral final (**Anexo C**), con estructura molecular (SMILES), fórmula y clases químicas, arrojaron 2193 metabolitos únicos y filtrados por masa, distribuidos entre todos los sujetos de estudio (**Tabla 3**). La mayoría de los metabolitos detectados se encuentran en un rango de masa menor a 500 Da y muy pocos metabolitos de alto peso molecular (>1500 Da) (**Figura 3**).

Tabla 3. Resumen de identificaciones a nivel de estructura molecular (SMILES). Da: Dalton, FDR: False Discovery Rate, ppm: partes por millón.

Plataforma	Filtro	Potenciales metabolitos
GNPS	< 10 ppm	177
Dereplicator (DR)	> 600 Da, FDR < 5, < 10 ppm	31
Moldiscovery (MD)	> 400 Da, FDR < 5, < 10 ppm	17
Sirius (MZmine .MGF)	< 600 Da, < 10 ppm	2415
TOTAL	SMILES Únicos	2193

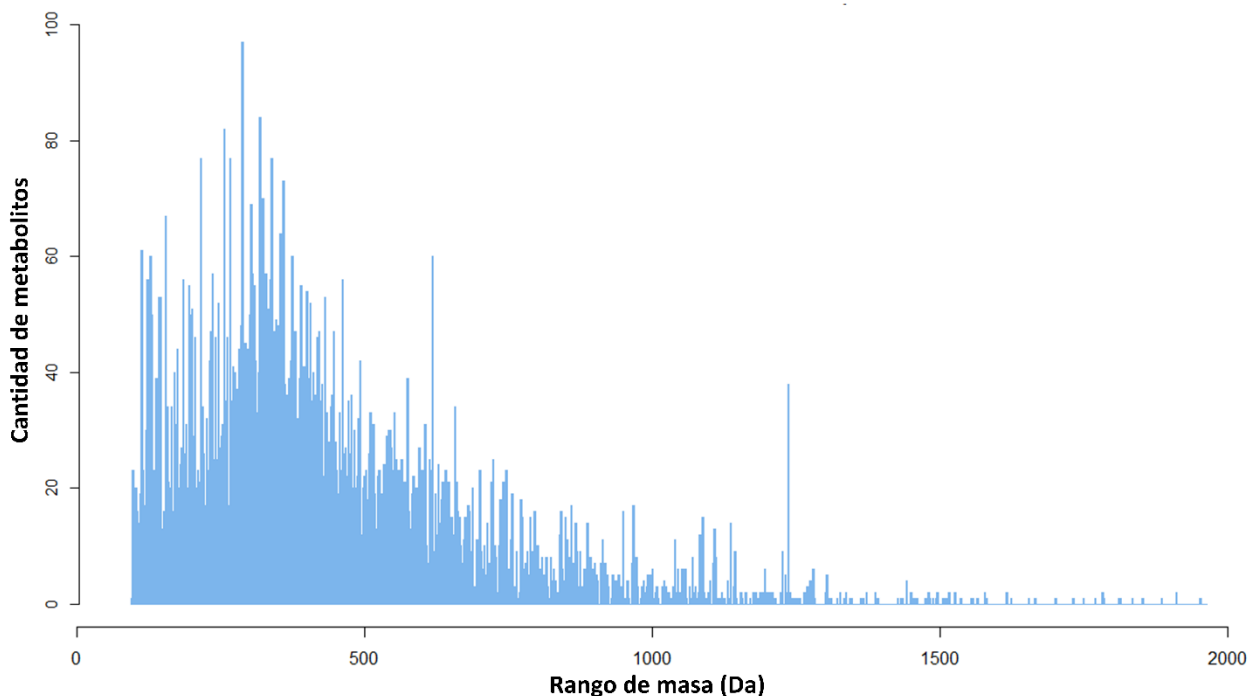


Figura 3. Distribución de la masa molecular (en Da.) de todos los metabolitos detectados en la piel humana en los distintos grupos de edad. Tamaño de bin = 5 Da. Número de bins = 434.

El análisis de CANOPUS por archivo .MGF clasificó inicialmente 3036 metabolitos en 105 clases químicas diferentes, de los 3134 metabolitos identificados por Sirius. Para obtener una lista de mayor confiabilidad, se aplicó un filtro de calidad para los metabolitos identificados por Sirius, utilizando la masa como parámetro (< 600 Da, < 10 ppm), lo que arrojó a 2358 metabolitos en 92 clases químicas y 57 metabolitos sin clasificación. Por último, se eliminaron los repetidos, lo que resultó en 2097 metabolitos únicos en 92 clases químicas y 53 metabolitos sin clasificación (**Figura 19, Anexo**). Este mismo análisis fue realizado con el método de alineamiento de archivos .mzML en Sirius, no obstante, el resultado arrojó solamente alrededor de un 20% de identificaciones en comparación con el análisis por .MGF (**Figura 20, Anexo**).

Más del 50% de clases químicas encontradas estuvieron conformadas por muy pocos elementos para considerarlas como clases químicas representativas del metaboloma de la piel, por lo que sólo se tomaron en cuenta aquellas que estuvieran comprendidas por al menos 6 metabolitos, lo que resultó en 33 clases químicas representativas. Bajo este criterio, las clases químicas predominantes fueron los ácidos carboxílicos (43.6%), acilos grasos (10.5%), derivados de benceno (5.77%), organo-oxigenados (4.33%) y organo-nitrogenados (6.93%). Algunas clases menos comunes (menos de 0.4%) fueron ácidos cinámicos (0.279%), ácidos fosfóricos (0.326%), ácidos sulfónicos (0.326%), azacíclicos (0.326%), haluros de alquilo (0.326%), hidroxiácidos (0.372%), lactonas (0.326%), naftalenos (0.279%) y piperidinas (0.372%) (**Figura 4**).

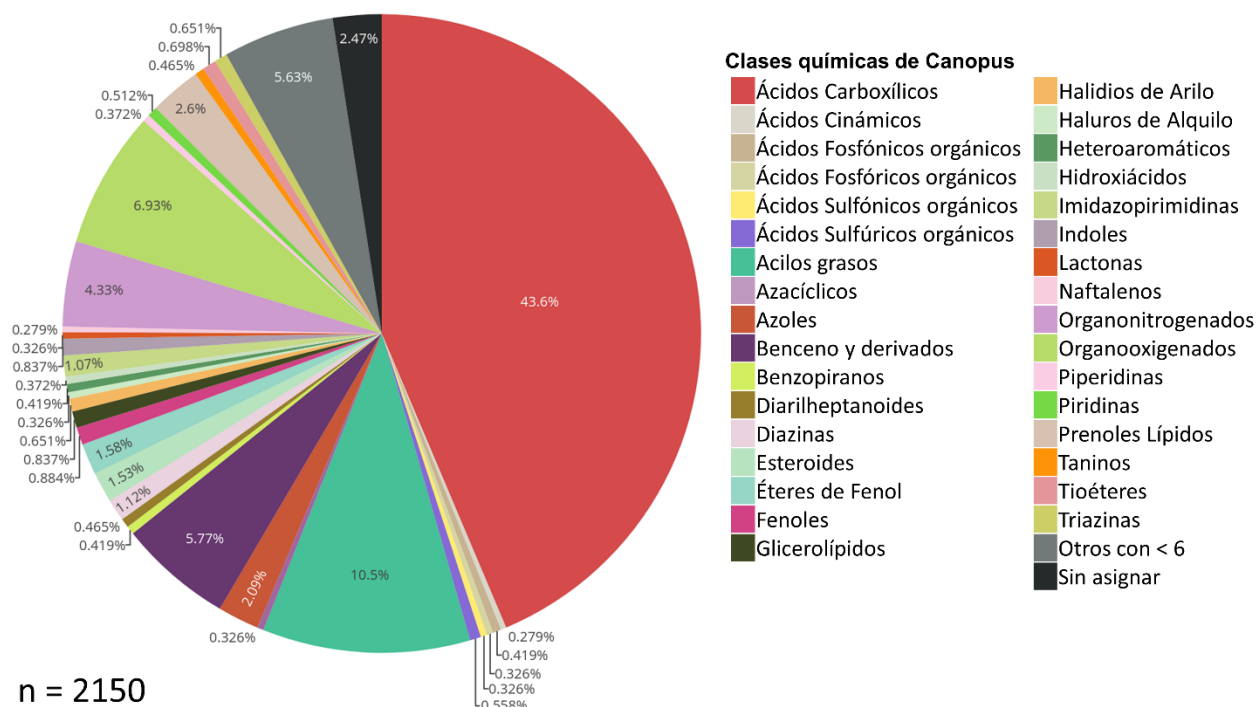


Figura 4. Distribución de las 33 clases químicas representativas de la piel humana, de los metabolitos únicos clasificados por CANOPUS, analizados por archivo .MGF de MZmine. Se consideran únicamente metabolitos con masa < 600 Da y un error de masa < 10 ppm. Todas las clases químicas que no están conformadas por al menos 6 metabolitos se agrupan en “Otros con < 6” (5.63%). 53 metabolitos (2.47%) no fueron clasificados.

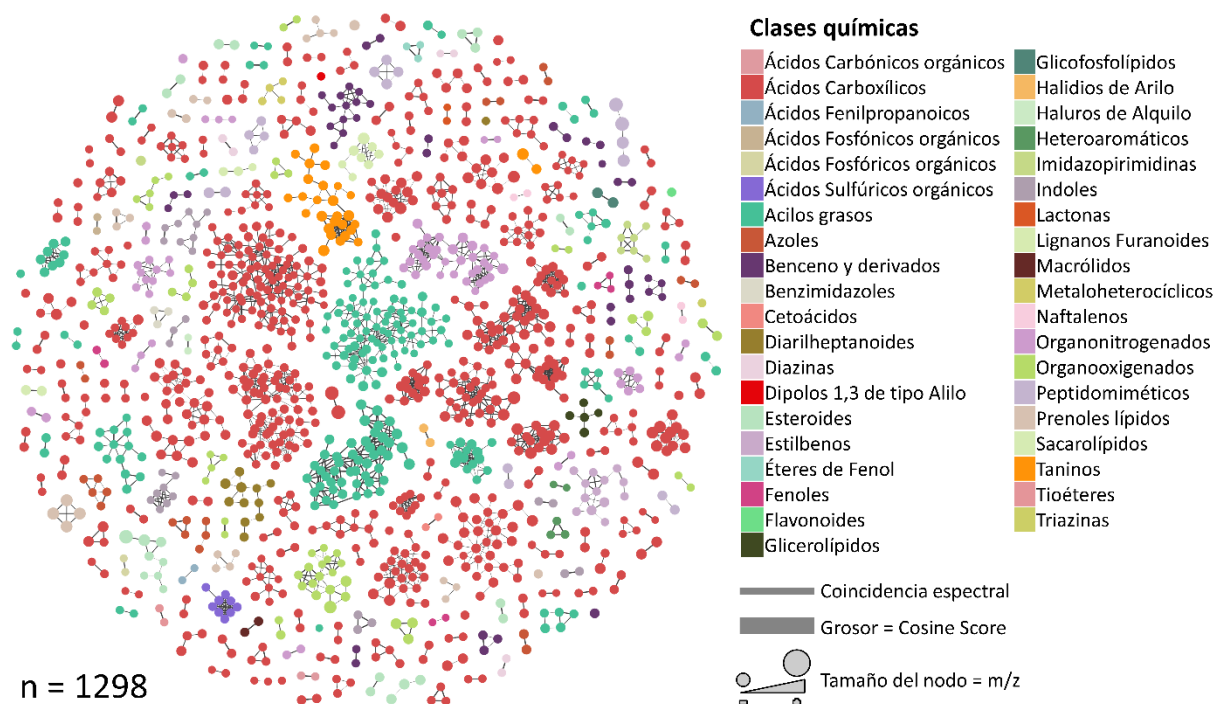


Figura 5. Red molecular de GNPS enriquecida con clases químicas de CANOPUS y ClassyFire. Visualización de 1298 nodos anotados y asociados a un clúster, las cuales comprenden 39 clases químicas diferentes. Algunos nodos aparecen como “singletons” porque sus nodos vecinos no fueron identificados, por lo que se eliminaron. Las clases de los nodos se asignaron conforme a la clase química más predominante en cada clúster. El tamaño de los nodos indica la proporción de la masa del metabolito (m/z).

La red molecular construida con GNPS cuenta con un total de 8693 nodos, que forman 298 clústeres y entre los cuales se encuentran 218 metabolitos identificados a nivel de estructura química. Esta red fue enriquecida con anotaciones de MolDiscovery, Dereplicator y Sirius, así como clases químicas de ClassyFire, lo que resultó en un total de 3172 nodos identificados (**Figura 18, Anexo**), y 1298 nodos con identificación asociados a un clúster (**Figura 5**). Los 7217 nodos restantes, denominados *singletons*, son nodos cuyo espectro de fragmentación no tuvo ninguna relación con algún otro.

3.3 Clases químicas diferenciadas por la edad

Para examinar las diferencias por edad en las clases químicas, se separaron los conjuntos de datos en dos cohortes, tomando la mediana de la edad como parámetro de corte: jóvenes (37 años o menos) y mayores (38 años o más). La **Tabla 4** muestra las características resumidas de ambos grupos. La mayoría de los jóvenes, especialmente los niños, tienen una mayor parte de su vida viviendo en la ciudad, mientras que la mayoría de los mayores no se criaron aquí. Los análisis de esta sección se basaron en estas divisiones.

Tabla 4. Características de los grupos del estudio. Altura, peso, IMC y TRC son la media de cada grupo. H: Hombre, M: Mujer, TRC: Tiempo relativo de vida residiendo en la ciudad, DE: desviación estándar.

Grupo de edad	Jóvenes (37 años o menos)	Mayores (38 años o más)
Participantes	H: 20 M: 20	H: 19 M: 16
Altura m ($\pm$ DE)	1.59 ($\pm$ 0.22)	1.66 ($\pm$ 0.095)
Peso kg ($\pm$ DE)	60.31 ($\pm$ 21.58)	72.5 ($\pm$ 13.25)
IMC kg/m ² ($\pm$ DE)	22.77 ($\pm$ 3.7)	26.09 ($\pm$ 3.6)
TRC (rango)	72% (4%-100%)	49% (4%-100%)

Se identificaron 1907 metabolitos con asignación de clase química de CANOPUS en jóvenes y 1828 en mayores. Ambas cohortes comparten las mismas clases químicas, pero al conservar solo aquellas con al menos 6 elementos, en los jóvenes se mantienen tres tipos de ácidos: cinámicos, sulfónicos orgánicos y fosfónicos orgánicos, todos con 6 elementos. Sin embargo, estos no son exclusivos de los jóvenes, ya que también están presentes en mayores con al menos 4 elementos (**Figura 6**). El mismo análisis con alineamiento de archivos .mzML arrojó más clases químicas únicas por cada cohorte, pero con una menor cantidad de identificaciones (alrededor del 20%), por lo que pierde significancia (**Figura 21, Anexo**).

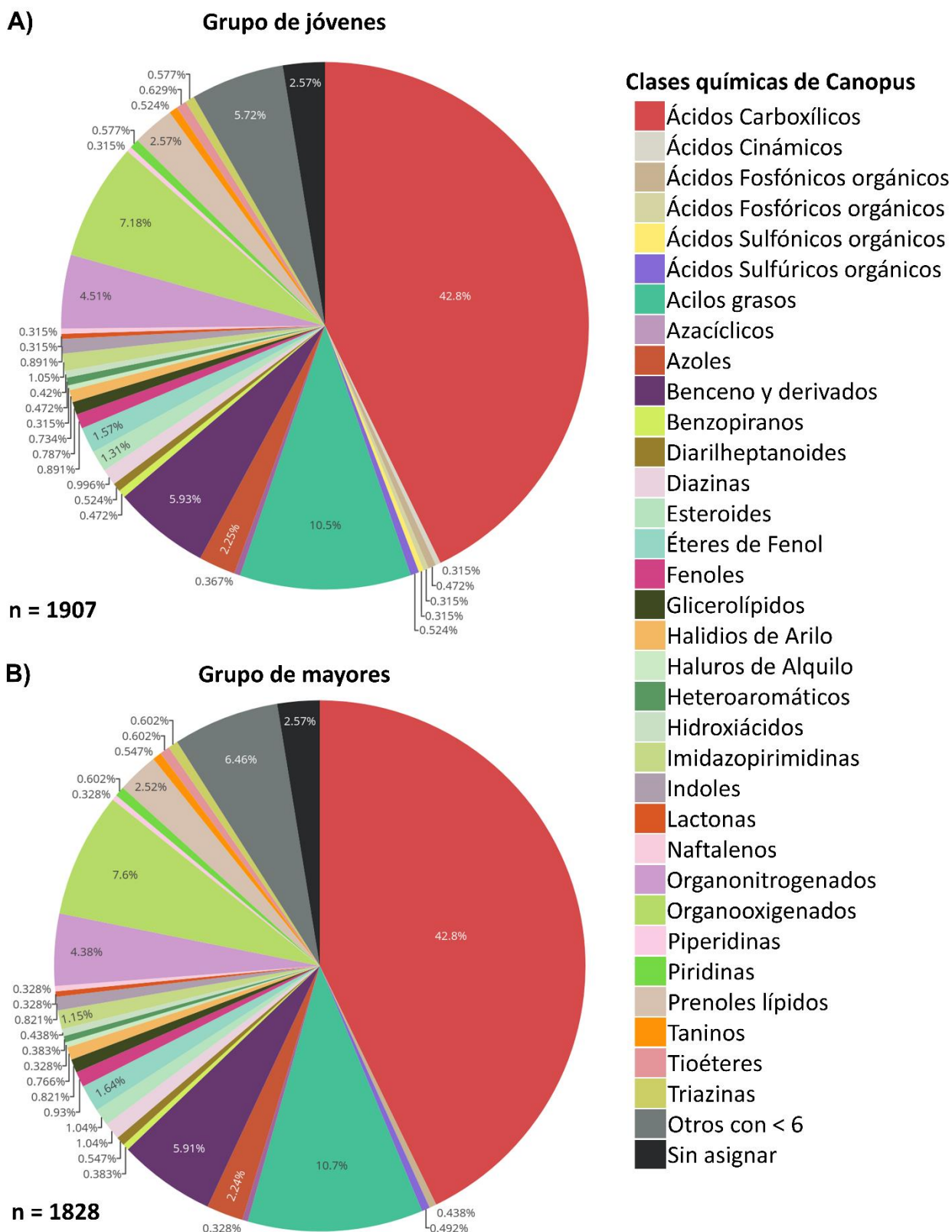


Figura 6. Distribución de clases químicas de todos los metabolitos únicos clasificados por CANOPUS, analizados por archivo .MGF de MZmine, divididos por cohortes. A) Presentes en jóvenes (37 años o menos). B) Presentes en mayores (mayores de 37 años). Se consideran únicamente metabolitos con masa < 600 Da y un error de masa < 10 ppm. Todas las clases químicas que no están conformadas por al menos 6 metabolitos se agrupan en “Otros con < 6”.

El índice de diversidad de Shannon para todos los casos (por género, por cohorte y por género-cohorte) se mantiene en valores de entre 2.4 a 2.9 (**Figura 7**). Las pruebas de Shapiro demostraron que todos los conjuntos siguen una distribución homogénea, y las pruebas F o Bartlett demostraron que sólo los conjuntos de hombres y mujeres no tienen varianzas semejantes entre sí. En ninguna de las agrupaciones propuestas existe una diferencia significativa por la prueba estadística correspondiente (**Figura 22, Anexo**).

Para poder encontrar diferencias en la abundancia de las clases químicas entre jóvenes y mayores, se realizó una prueba t por cada una de las clases químicas que se comparten entre sí. Para todas aquellas clases que pasaron el valor de significancia ($p < 0.05$), se construyó un gráfico de distribución tipo raincloud (**Figura 8**). Se encontraron un total de 8 clases significativas. Las clases que fueron predominantes en abundancia en el grupo de jóvenes fueron ácidos carboximídicos, diazinanos y dioxolopiranos, mientras que las clases que fueron predominantes en el grupo de mayores fueron azaspirodecanos, azoles, azolidinas, cetoácidos y sacarolípidos.

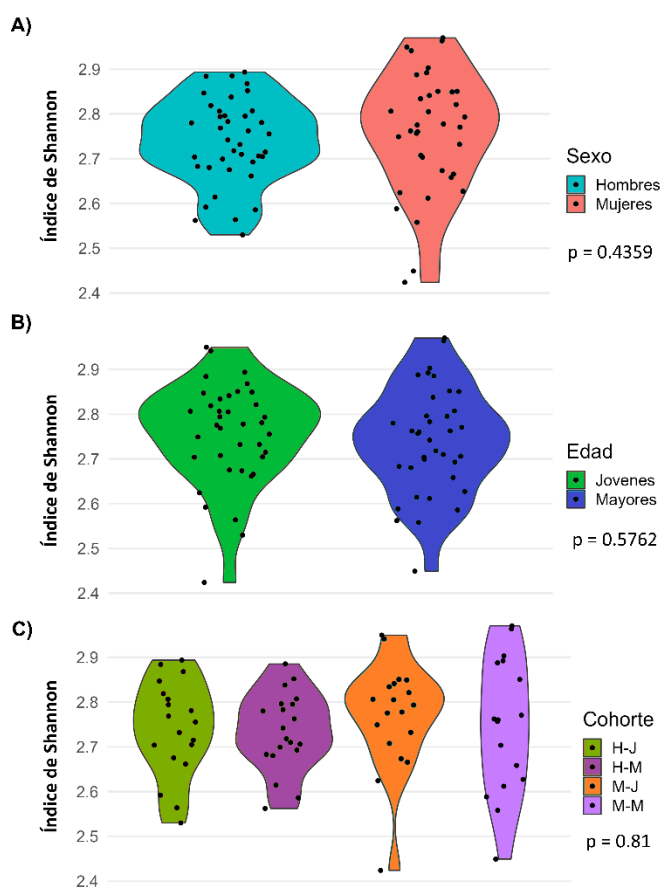


Figura 7. Distribución de diversidad química, expresado por el índice de diversidad de Shannon, calculado con la suma de las intensidades normalizadas por cada clase química. A) Por sexo biológico. B) Por grupo de edad. C) Por cohorte (sexo y grupo de edad). El valor p fue calculado con una prueba t, una prueba t de Welch, y un ANOVA, respectivamente. El ancho del diagrama refleja la densidad de datos en esa región. H-J: Hombres jóvenes, H-M: Hombres mayores, M-J: Mujeres jóvenes, M-M: Mujeres mayores.

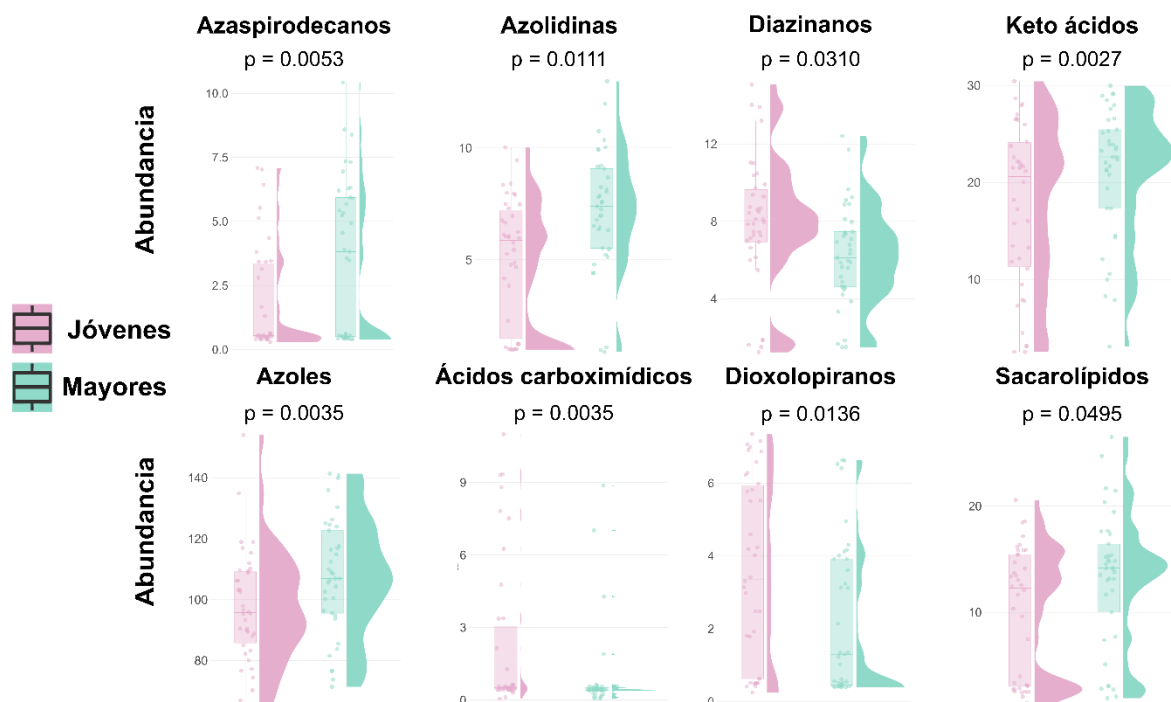


Figura 8. Perfil de distribución de clases químicas diferenciadas significativamente entre el grupo de jóvenes (37 años o menos) y mayores (mayores de 37 años). Para cada clase química se presenta un diagrama de caja, una distribución de densidad y un gráfico raincloud (nube de lluvia). El diagrama de caja muestra la mediana como valor central. La prueba t fue realizada al comparar la suma de las intensidades normalizadas por cada clase química entre cohortes.

3.4 Potenciales metabolitos del envejecimiento en la piel

El análisis univariante entre cohortes resultó en 54 metabolitos con anotación significativamente más abundantes, y 62 metabolitos menos abundantes, en la piel de los sujetos pertenecientes a la cohorte de mayores (**Figura 9**). Se observa que la diferencia de magnitud en la razón de cambio no es tan amplia entre los metabolitos con menor o mayor abundancia de los que no presentan cambios significativos. Entre los cinco metabolitos significativos mayormente abundantes se encuentran (1) Ciclo(Leu-Pro); (2) 1,5-Dihydroimidazo[1,5-b]pyrazol-6-one; (3) Pentanoic acid, 5-[[6-[[[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]hexyl]amino]-5-oxo-]; (4) Cafeína; (5) Destiobiotina, en ese orden de significancia. Por el contrario, los cinco metabolitos menos abundantes con mayor significancia fueron (1) (2R,3R,4R,5E)-1,3-dibutoxy-4-fluoro-5-methoxyiminopentan-2-ol; (2) N-[1-(6-ethylpyrimidin-4-yl)piperidin-4-yl]-2-(2-hydroxyethyl)piperidine-1-carboxamide; (3) (4-(Hexyloxy)-2-hydroxyphenyl)(phenyl)methanone; (4) 3-(3,5-Ditert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-oxopropanal; (5) [(1E,3E,6Z,10E)-3-(acetyloxymethylidene)-7-formyl-11,15-dimethyl hexadeca-1,6,10,14-tetraenyl] acetate. Estos resultados preliminares nos dan un primer indicio de cuáles serían los mejores candidatos para prestar atención en la búsqueda de biomarcadores de la edad en la piel.

Metabolitos significativos en la cohorte de mayores

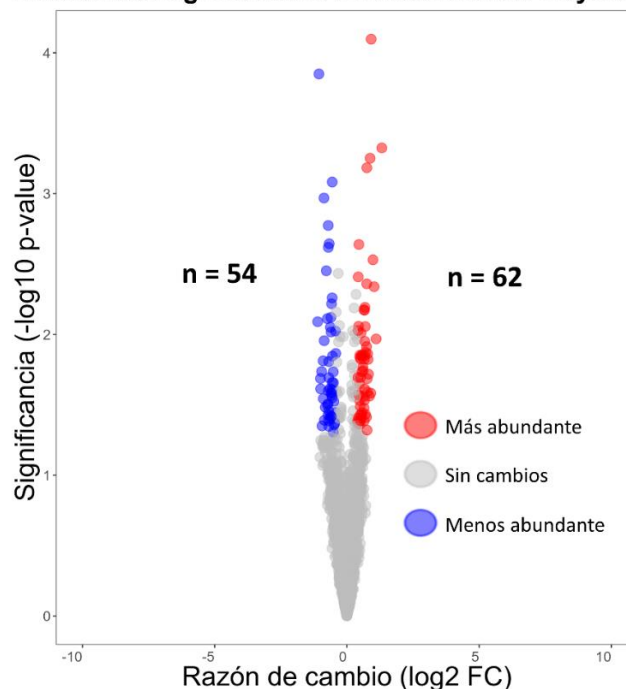


Figura 9. Gráfico de volcán que destaca los metabolitos con magnitud de cambio (mayor o menor abundancia) y significancia estadística en la piel de las personas pertenecientes a la cohorte de mayores (edad > 37 años). El eje vertical representa la significancia estadística, expresada como el negativo del log10 del valor p, donde los valores p más pequeños (parte superior) indican mayor significancia. El eje horizontal muestra la magnitud del cambio en los metabolitos, expresada como el log2 de la razón de cambio (FC). Los puntos en el gráfico representan metabolitos individuales, y su posición revela su relevancia en función de la significancia y el cambio. Los metabolitos significativos y con cambios sustanciales se encuentran en los extremos izquierdo (54 menos abundantes) y derecho (62 más abundantes) del gráfico, mientras que los cambios menos notables se ubican en el centro (sin cambios).

Por otro lado, el modelo lineal con ajuste de covariables en MetaboAnalyst identificó 272 metabolitos cuya abundancia está correlacionada con la edad para ambos sexos. La **Tabla 5** resume la cantidad de metabolitos correlacionados con la edad de manera positiva y negativa para ambos sexos, así como para hombres y mujeres individualmente. Para fines de visualización, las **Tablas 6 y 7** reportan los principales 10 metabolitos correlacionados de manera positiva y negativa, respectivamente.

Dentro de los metabolitos con mayor significancia positiva tanto en el análisis univariante y el bivalente, y que además se destacaron tras el escrutinio manual, se encuentra ciclo(Leu-Pro), con la mayor correlación encontrada en el estudio ($a = 4.1857$, $b = 0.1977$, $p = 0.000081$), seguido de destiobiotina ($a = 3.436$, $b = -1.7856$, $p = 0.00099$), también dentro de los 10 metabolitos mayormente correlacionados. Por último, con una alta correlación negativa se destacó a N-[1-(6-ethylpyrimidin-4-yl)piperidin-4-yl]-2-(2-hydroxyethyl)piperidine-1-carboxamide ($a = -3.6362$, $b = -1.5857$, $p = 0.00052475$). Los tres metabolitos funcionan como principales candidatos a biomarcadores del envejecimiento en la piel. Una representación más detallada de las asociaciones de estos metabolitos en su respectiva subred se encuentra en **Figura 10**.

Tabla 5. Resumen de metabolitos correlacionados positiva y negativamente por sexo

Género	Correlación positiva	Correlación negativa	Total
Ambos	135	132	272
Masculino	158	97	250
Femenino	43	74	123

Tabla 6. Principales 10 metabolitos correlacionados positivamente con la edad considerando ambos sexos.

Anotación	Fórmula	Masa experimental	Masa exacta	RT (min)	Nombre	Clase química	Pendiente	Intersección	Valor P
GNPS	C11H18N2O2	211.1395	210.1368	9.54	Cyclo (L-Leu-L-Pro)	Ácidos carboxílicos y derivados	4.1857	0.1978	0.000081
Sirius	C12H14O3	207.1004	206.0942	13.64	6-(6-Oxocyclohexa-1,3-dien-1-yl)hex-5-enoic acid	Ácidos carboxílicos y derivados	3.8569	-0.8889	0.000253
GNPS	C8H10N4O2	195.0888	194.0803	6.51	Caffeine	Imidazopirimidinas	3.7085	-0.9536	0.000411
Sirius	C16H30N2O5	331.2224	330.2154	8.17	Pentanoic acid	Ácidos carboxílicos y derivados	3.4876	-2.0391	0.000847
Sirius	C21H32N4O6	437.2356	436.2321	10.74	H-Phe-Ala-xiThr-Val-OH	Ácidos carboxílicos y derivados	3.4466	-1.7538	0.000959
Sirius	C10H18N2O3	215.1388	214.1317	10.19	Dethiobiotin	Azoles	3.4360	-1.7856	0.000992
Sirius	C5H5N3O	124.0504	123.0432	2.74	1,5-Dihydroimidazo[1,5-b]pyrazol-6-one	Diazinas	3.2774	-2.2486	0.001625
Sirius	C9H17NO2	172.1332	171.1259	10.18	Gabapentin	Ácidos carboxílicos y derivados	3.2449	-2.3417	0.001796
Sirius	C13H24N2O5	289.1755	288.1685	10.33	1,3-Bis(5-carboxypentyl)urea	Acilos grasos	3.2111	-3.2550	0.002002
Sirius	C9H16O2	157.1216	156.1150	13.97	5-Cyclobutylpentanoic acid	Lactonas	3.1492	-3.4292	0.002412

Tabla 7. Principales 10 metabolitos correlacionados negativamente con la edad considerando ambos sexos.

Anotación	Fórmula	Masa experimental	Masa exacta	RT (min)	Nombre	Clase química	Pendiente	Intersección	Valor P
Sirius	C20H31N3O5	416.2158	393.2263	25.45	tert-butyl N-[6-[3-(2-hydroxyphenyl)propanoylamino]hexanoylamino]carbamate	Ácidos carboxílicos y derivados	-3.6758	-1.0559	0.000458
Sirius	C19H31N5O2	362.2538	361.2477	15.52	N-[1-(6-ethylpyrimidin-4-yl)piperidin-4-yl]-2-(2-hydroxyethyl)piperidine-1-carboxamide	Ácidos grasos	-3.6362	-1.5857	0.000525
Sirius	C19H22O3	299.1624	298.1568	26.72	(4-(Hexyloxy)-2-hydroxyphenyl)(phenyl)methanone	Esteres fenoles	-3.2545	-2.3143	0.001744
Sirius	C9H11	119.0856	119.0860	25.74	Propan-2-ylcyclohexatriene	Lípidos prenoles	-3.1864	-2.5072	0.002144
Sirius	C11H12O3	193.0868	192.0786	23.19	Methyl p-methoxycinnamate	Ácidos cinámicos y derivados	-3.1518	-3.4218	0.002394
Sirius	C15H29NO6	320.2073	319.1994	25.60	2-[2-[2-[2-(2-oxobutoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]-N-propan-2-ylacetamide	Ácidos carboxílicos y derivados	-3.1187	-2.6961	0.002627
Sirius	C16H14O6	303.0858	302.0790	24.61	Sterubin	Benzopirenos	-3.0839	-3.2016	0.002924
Sirius	C19H36N4O5S	433.2489	432.2406	19.58	DL-isoleucyl-glycyl-DL-methionyl-DL-isoleucine	Ácidos carboxílicos y derivados	-3.0817	-4.1552	0.002951
DR	C48H75N17O13	549.793	1097.5730	15.01	H-Leu-D-Leu-His-Asp-His-Pro-Asn-Pro-Arg-OH	Ácidos carboxílicos y derivados	-2.9941	-3.0354	0.003790
Sirius	C11H14N2O6	271.0944	270.0851	3.96	2-Acetamido-2-(4-acetamidobut-2-ynyl)propanedioic acid	Ácidos carboxílicos y derivados	-2.9821	-3.0676	0.003925

Para complementar los hallazgos de biomarcadores a nivel individual, se reportan los resultados de análisis de enriquecimiento químico, que proveen un panorama más completo de la regulación de metabolitos como conjuntos de clases químicas diferenciadas. De los 272 metabolitos utilizados en el análisis, 155 se encontraron dentro de las clases químicas diferenciadas. Las clases con mayor significancia y a la vez mayor cantidad de metabolitos fueron los ácidos carboxílicos (con Ciclo(Leu-Pro) como componente principal), acilos grasos, compuestos organooxygenados y derivados de benceno. Este resultado es de alguna manera esperado debido a que todas ellas se encuentran entre los metabolitos con mayor representación en la piel tanto en jóvenes como en mayores (**Figura 4 y 6**). Las clases químicas con la mayor magnitud de cambio positiva fueron los polipéptidos, como Gly-Gly-Ala; azoles, como 1,5-Dihydroimidazo[1,5-b]pyrazol-6-one; y diazinas, como 4-Amino-1-[1-(4-fluoro-1,3-dihydroxypentan-2-yl)oxyethyl]pyrimidin-2-one. También se encontraron fuertemente diferenciados metabolitos sin una asignación química (**Figura 11**). La mayoría de los metabolitos encontrados como significativamente diferenciados entre cohortes fueron también encontrados como componentes principales de su clase química respectiva.

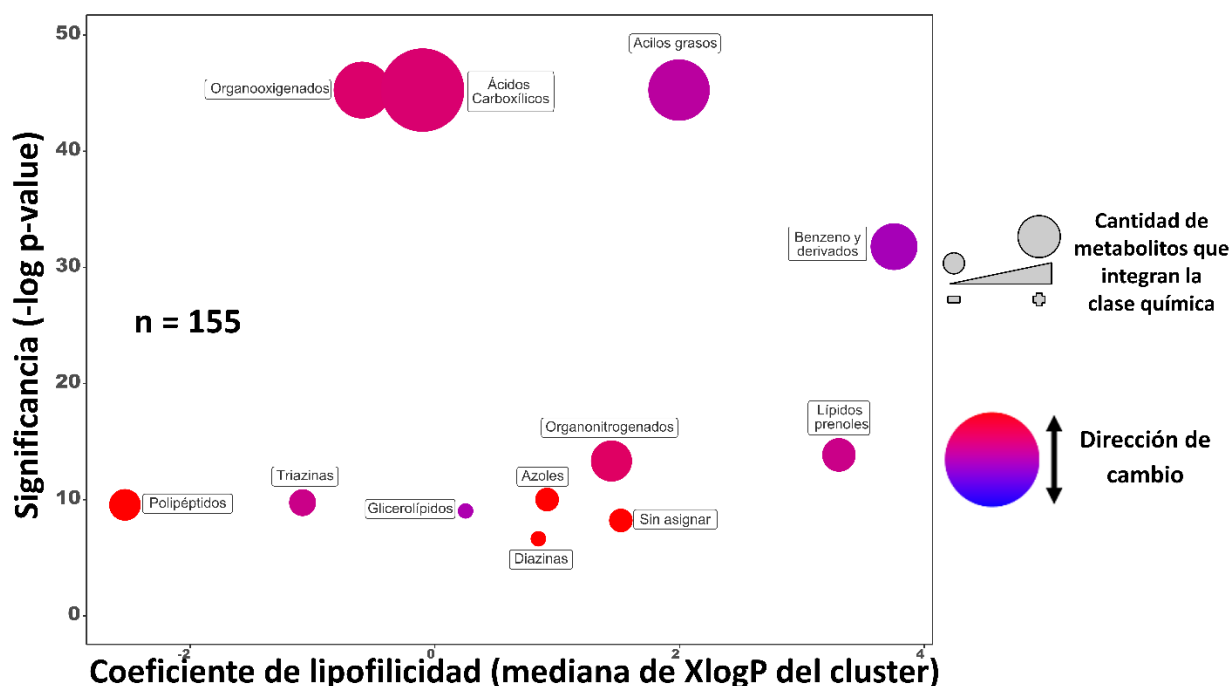


Figura 11. Análisis de enriquecimiento químico con ChemRICH. Se utilizaron los 272 metabolitos reportados por MetaboAnalyst como significativamente correlacionados, y el FC calculado entre las cohortes de jóvenes (edad ≤ 37 años) y mayores (edad > 37 años). El eje vertical representa la significancia estadística, expresada como el negativo del logaritmo del valor p, donde los valores p más pequeños (parte superior) indican mayor significancia. El eje horizontal muestra el coeficiente de partición octanol-agua (o lipofilicidad) de la clase química, que indica cuán soluble es un metabolito en aceite en comparación con el agua, por lo que se usa para expresar la similitud química entre clases. Valores más altos de XlogP indican una mejor capacidad del metabolito de disolverse en sustancias grasas. El tamaño del nodo indica la abundancia de la clase química (cantidad de metabolitos que la componen). El color del nodo indica la dirección de cambio, con rojo como clases químicas que mayormente incrementan con la edad; azul las clases químicas que mayormente disminuyen con la edad; y morado que indica clases químicas compuestas por metabolitos que incrementan y disminuyen.

Capítulo 4. Discusión

En el campo de la metabolómica del envejecimiento, se ha prestado considerable atención a diversas fuentes biológicas, como la sangre, orina y saliva. No obstante, el enfoque en el metaboloma de la piel ha sido relativamente poco explorado, como se observa en estudios previos (Panyard et al., 2022). Además, es importante destacar que la mayoría de los estudios sobre envejecimiento se han realizado principalmente en Europa, seguidos de algunos en América del Norte. Estos estudios han variado significativamente en cuanto al tamaño de la muestra, desde decenas hasta miles de participantes (Paganelli et al., 2022; Panyard et al., 2022). Sin embargo, pocos estudios han investigado específicamente el metaboloma de la piel en el contexto del envejecimiento. Por lo tanto, el presente estudio representa un primer paso para comprender el efecto del envejecimiento de la piel en sujetos mexicanos bajo una aproximación metabolómica.

Hasta donde nosotros sabemos y de acuerdo con algunas revisiones sistemáticas (Paganelli et al., 2022; Panyard et al., 2022), el único estudio de naturaleza similar al propuesto aquí (metabolómica de la edad en la piel) comprende una población de 28 mujeres jóvenes (de 20 a 25 años) y 54 personas mayores (de 55 a 66 años) de origen asiático (Kuehne et al., 2017). En contraparte, nuestro estudio cubre un total de población similar, pero con un rango de edades más amplio (de 3 a 74 años) y considerando ambos sexos, por lo que representa un estudio más completo sobre el envejecimiento de la piel. Es importante recalcar que la ciudad de Ensenada se caracteriza por estar junto a la costa, tener un clima seco mediterráneo templado y la dieta suele incluir productos de origen marino. Además, la población de Ensenada se encuentra cerca de la frontera, lo que le da una dinámica socioeconómica característica y diferenciada del resto del país. Todo esto, sumado a los metadatos recopilados de los sujetos de estudio, son factores exógenos que potencialmente pueden alterar el metaboloma, lo que a su vez puede sesgar los presentes hallazgos.

El método de muestreo también es una característica distintiva de este estudio. El estudio mencionado anteriormente (Kuehne et al., 2017) realizó un muestreo con ampollas de succión en la parte interna del brazo, lo que lo vuelve un método ligeramente invasivo al remover físicamente pequeñas partículas de la epidermis. El único estudio que hasta ahora ha utilizado hisopos de algodón como método de muestreo no invasivo en la piel ha sido el de Bouslimani et al. (2015). Sin embargo, el enfoque no fue dentro de la evaluación del envejecimiento. El presente estudio es el primero en utilizar un método de muestreo no invasivo en la piel para la evaluación de biomarcadores.

Respecto a los resultados de metabolómica, Kuehne et al. (2017) reportaron 4, 585 iones en la piel con un Agilent QTOF 6550 por LC-MS2, de los cuales identificaron 2, 530 putativamente en la HMDB. Nosotros fuimos capaces de detectar hasta 8, 693 nodos por la aproximación FBMN, de los cuales identificamos putativamente 2, 193 metabolitos únicos utilizando diversas herramientas, la gran mayoría de ellos encontrados en PubChem (**Anexo C**). Este resultado representa un 25% de identificación del total de potenciales metabolitos. También hemos realizado la comparación de resultados bajo la aproximación CMN, con la que se obtuvieron más anotaciones en la plataforma GNPS, pero un número considerablemente menor en la plataforma de Sirius. Debido a esto, y a la importancia de incluir análisis cuantitativos, consideramos que la aproximación por FBMN entrega mejores resultados.

Es esencial resaltar que durante la revisión manual de la librería espectral se encontraron discrepancias de los SMILES y nombres obtenidos en las plataformas, de modo que se tuvo que realizar una revisión exhaustiva para depurar la información. Este proceso resultó en la eliminación de algunos metabolitos por considerarlos anotaciones de baja confiabilidad. Este problema se hizo mayormente presente conforme incrementaba la masa de los metabolitos, lo que apunta a que los metabolitos de gran peso molecular suelen ser los menos reportados y estudiados. Esto abre paso a un área de oportunidad en la búsqueda de metabolitos de interés biológico.

Además de los aportes mencionados, también hemos adoptado un enfoque único al presentar resultados a nivel de clases químicas, brindando así una visión más completa de los cambios metabólicos asociados con el envejecimiento cutáneo. Esta información la hemos aprovechado para proyectar una red molecular enriquecida por clase química. En ese sentido, los resultados sugieren que no existe una amplia diferencia a nivel global de las clases químicas representativas entre las cohortes (**Figura 6 y 7**), pero sí parece haber diferencias puntuales en ciertos grupos de metabolitos (**Figura 8**). Esto representa una contribución significativa para comprender las interacciones metabólicas en la piel en función de la edad.

Como último análisis comparativo, en un modelo desarrollado por Lassen et al. (2023), a través de un metaanálisis de 9, 929 metabolomas de sangre en hombres, lograron encontrar 8, 038 potenciales metabolitos, de los cuales 1, 867 resultaron tener una correlación con la edad, pero solo 145 fueron identificados. En contraste, nosotros identificamos 272 potenciales biomarcadores del envejecimiento en la piel para ambos sexos, bajo un análisis de correlación ajustado por covariables. Esta diferencia de relación entre metabolitos detectados contra identificados parece indicar que las herramientas de identificación en nuestro estudio son lo suficientemente robustas para encontrar una cantidad de potenciales biomarcadores equiparable con otros estudios a gran escala. Del mismo modo, también

identificamos 250 potenciales biomarcadores en hombres y 123 en mujeres, lo cual es un diferenciador de otros estudios que sólo han realizado análisis en un solo sexo. Aún desconocemos la razón del por qué hay una disparidad considerable en la cantidad de biomarcadores encontrados entre los sexos, de ahí que sea imperativo analizar con mayor profundidad estos resultados, mismos que pueden ayudar en la elaboración de modelos para la predicción de abundancia de metabolitos en función de la edad.

De entre los potenciales biomarcadores de la edad encontrados en este estudio, destacamos el hallazgo de la molécula Ciclo(leu-pro) ($m/z = 211.1395$ Da, $RT = 9.54$ min, $p = 0.000081$), que tuvo tanto el valor de significancia más bajo de todo el estudio, como el valor de correlación positiva más alto (**Figura 10A**). Cabe destacar que este mismo metabolito fue reportado por el modelo de Lassen et al. (2023) en sangre como un biomarcador del envejecimiento, lo que apoya la confiabilidad de nuestro hallazgo. Según la bibliografía de la base de datos CHEBI (Chemical Entities of Biological Interest, <https://www.ebi.ac.uk/chebi/>, CHEBI:133094), Ciclo(leu-pro) es un metabolito marino que se ha asociado con la inhibición de una aflatoxina producida por el género *Aspergillus* (Yan et al., 2004) y con la protección contra el daño oxidativo en células epiteliales en modelos *in vitro* (Deepak et al., 2020). Este metabolito se ha identificado previamente en la esponja marina japonesa *Discodermia calyx* (He et al., 2013) y en *Achromobacter xylosoxidans* (Yan et al., 2004), una bacteria Gram-negativa que se encuentra tanto en seres humanos como en entornos acuáticos. Dado que este metabolito también fue identificado por Lassen et al. (2023) —estudio realizado en las costas de Dinamarca— surge la idea de si este metabolito está asociado a residir en una ciudad costera como Ensenada.

Otro posible biomarcador sugerido por nuestro hallazgo, también con correlación positiva, es la molécula Destiobiotina ($m/z = 215.1388$ Da, $RT = 10.19$ min, $p = 0.000992$), la cual no ha sido reportado antes en otro estudio como biomarcador del envejecimiento. Destiobiotina, perteneciente a la clase de azoles (subclase de imidazoles), es un precursor directo de la Biotina, una vitamina esencial para el desarrollo celular que debe ser adquirido por la dieta, y en la que se ha visto un incremento de su abundancia con el envejecimiento en el torrente sanguíneo en un modelo murino (Said et al., 1990). Hacemos notar que dentro del clúster de Destiobiotina se encuentran asociados también otros dos metabolitos correlacionados positivamente: el acilo graso 1,3-Bis(5-carboxypentyl)urea, y Gababutin, un metabolito muy similar al anticonvulsivo Gabapentin (**Figura 10B**).

De este último hallazgo, podemos resaltar que Gabapentin también se encuentra dentro de los 10 principales metabolitos con correlación positiva, y que dentro de la misma subred se encuentra Gabapentin-lactam, otro metabolito muy similar con correlación positiva. Sin embargo, aún

desconocemos si la presencia de esta familia de metabolitos es de origen endógeno o exógeno. Debido a que estos metabolitos se hallaron en una gran cantidad de sujetos de todas las edades, descartamos que se deba a la ingesta del medicamento Gabapentin, pero podría considerarse que estamos expuestos a estos en el ambiente. Otra posible explicación es que estos hallazgos corresponden en realidad a otro grupo de metabolitos (endógenos o exógenos) muy similares, pero aún sin identificar, por lo que realizar una metabolómica dirigida con un estándar de Gabapentin podría ayudarnos a dilucidar esta incógnita.

Con una correlación negativa resaltamos la piperidina N-[1-(6-ethylpyrimidin-4-yl)piperidin-4-yl]-2-(2-hydroxyethyl)piperidine-1-carboxamide ($m/z = 362.2538$ Da, $RT = 15.52$ min, $p = 0.000525$), del cual se desconoce su efecto, pero que sorpresivamente, también se encuentra asociado a un clúster con otros 13 metabolitos que resultaron estar correlacionados negativamente. De entre estas, destacamos un par de metabolitos: N-(1-Cyanocyclobutyl)-2-{4-[(cyclohexylcarbamoyl)amino]-1-piperidinyl}acetamide, un ácido carboxílico con un perfil de correlación muy similar al anterior mencionado; y el tripéptido Gly-Arg-Lys, que, aunque con un perfil de correlación pobre, llama la atención que estuvo únicamente presente en el grupo de jóvenes y con una evidente abundancia mayor en niños (menores de 10 años). Esto representa un comportamiento que se repite en los otros nodos con el mismo nombre que también tuvieron correlación negativa (**Figura 10C**). Aunque ninguno de los metabolitos mencionados, incluyendo los de la subred, se han reportado como biomarcadores del envejecimiento, el alto número de asociaciones entre moléculas con una respuesta similar ante la edad nos sugiere que podría existir un proceso metabólico que está fuertemente subregulado conforme avanza la edad de los sujetos. No obstante, la una gran heterogeneidad en las clases químicas asociadas complica la interpretación de la vía metabólica implicada.

Para concluir, este estudio es el primero en utilizar el análisis de enriquecimiento químico por ChemRICH para reportar las clases químicas alteradas con relación a la edad (**Figura 11**). Entre las clases químicas reportadas por este análisis, sólo coinciden los azoles con los resultados de clases químicas significativas entre cohortes (**Figura 8**), misma a la cual pertenece destiobiotina; uno de los biomarcadores del envejecimiento propuestos. Los azoles están ampliamente estudiados como agentes antifúngicos, como itraconazol y fluconazol (Shafiei et al., 2020), sin embargo, aún no existe evidencia más allá de la reportada en este trabajo que indique alguna relación entre este grupo de metabolitos y el envejecimiento.

Es importante resaltar que este estudio utiliza datos limitados de una población específica y la metodología de adquisición de datos puede sesgar la observación de algunos metabolitos. Generalizar los hallazgos a poblaciones más amplias requeriría repetir experimentos con variaciones significativas y ser más exhaustivo con el control de variables de la población, sobre todo en los hábitos de consumo.

Capítulo 5. Conclusiones

Este estudio se fundamentó en el empleo de la metabolómica, empleando un enfoque integral que incorpora diversas herramientas de anotación *in silico*, refinamiento, filtración y visualización de datos. El proceso de adquisición de datos y las herramientas quimioinformáticas utilizadas resultaron en una considerable cantidad de detecciones e identificaciones de metabolitos, respectivamente. La aplicación de esta metodología permitió explorar exhaustivamente el perfil metabólico de las muestras de piel, lo que proporciona una visión detallada del estado basal de la piel a nivel metabolómico y la influencia de la edad como factor de cambio endógeno.

Nuestro análisis reveló hasta 272 potenciales biomarcadores asociados al envejecimiento tanto para individuos de ambos sexos como en contextos específicos de género. A pesar del número limitado de muestras analizadas, logramos establecer correlaciones significativas entre varios metabolitos y clases químicas con la edad por varios métodos complementarios. Estos hallazgos no solo subrayan la sensibilidad de las técnicas empleadas sino también sugieren la existencia de un espectro más amplio de biomarcadores en espera de ser identificados. Por esto, se propone que existen procesos metabólicos que experimentan cambios en diferentes etapas del desarrollo humano. La identificación de las principales clases químicas afectadas agrega profundidad a nuestra comprensión del proceso metabólico implicado en el envejecimiento cutáneo y del cuerpo en general.

Cabe destacar que este estudio se enfocó en una población específica y contemplo un número limitado de muestras. La metodología, que incluye LC-MS2 y métodos de extracción de metabolitos altamente específicos, podrían sesgar la observación a sólo un espectro del universo total de metabolitos disponibles a ser identificado. También, los resultados obtenidos de las plataformas de anotación *in silico* aún requieren de una inspección manual para cerciorarse de la identificación de los metabolitos obtenida. Por último, es importante reconocer que la generalización de los hallazgos a poblaciones más amplias podría requerir la repetición de experimentos con variaciones significativas y la inclusión de datos adicionales.

A pesar de los avances alcanzados en la identificación de biomarcadores del envejecimiento de la piel y la caracterización de las clases químicas involucradas, nuestro estudio pone de manifiesto que aún existe un vasto terreno por explorar. Quedan interrogantes sustanciales por resolver, como las rutas metabólicas específicas implicadas en este proceso y la identificación de biomarcadores hasta ahora inexplorados. Estos resultados subrayan la complejidad y la riqueza de la relación entre el envejecimiento y el metabolismo cutáneo. Esto en conjunto, proporciona una base sólida base para futuras investigaciones que podrían contribuir al desarrollo de enfoques terapéuticos y cuidados de la piel más efectivos; un tema que se encuentra actualmente bajo exploración. Finalmente, este trabajo podría sentar las bases para un nuevo campo en la metabolómica no invasiva, enfocado en biomarcadores del estado de salud y la revelación de procesos metabólicos inexplorados.

Literatura citada

- Al Dhaybi, R., Agoumi, M., Gagné, I., McCuaig, C., Powell, J., & Kokta, V. (2011). p16 expression: A marker of differentiation between childhood malignant melanomas and Spitz nevi. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65(2), 357-363. <https://doi.org/10.1016/J.JAAD.2010.07.031>
- Auro, K., Joensuu, A., Fischer, K., Kettunen, J., Salo, P., Mattsson, H., Niironen, M., Kaprio, J., Eriksson, J. G., Lehtimäki, T., Raitakari, O., Jula, A., Tiitinen, A., Jauhiainen, M., Soininen, P., Kangas, A. J., Kähönen, M., Havulinna, A. S., Ala-Korpela, M., ... Perola, M. (2014). A metabolic view on menopause and ageing. *Nature Communications*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms5708>
- Barupal, D. K., & Fiehn, O. (2017). Chemical Similarity Enrichment Analysis (ChemRICH) as alternative to biochemical pathway mapping for metabolomic datasets. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15231-w>
- Bormann, F., Rodríguez-Paredes, M., Hagemann, S., Manchanda, H., Kristof, B., Gutekunst, J., Raddatz, G., Haas, R., Terstegen, L., Wenck, H., Kaderali, L., Winnefeld, M., & Lyko, F. (2016). Reduced DNA methylation patterning and transcriptional connectivity define human skin aging. *Aging Cell*, 15(3), 563-571. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12470>
- Bouslimani, A., Porto, C., Rath, C. M., Wang, M., Guo, Y., Gonzalez, A., Berg-Lyon, D., Ackermann, G., Moeller Christensen, G. J., Nakatsuji, T., Zhang, L., Borkowski, A. W., Meehan, M. J., Dorrestein, K., Gallo, R. L., Bandeira, N., Knight, R., Alexandrov, T., & Dorrestein, P. C. (2015). Molecular cartography of the human skin surface in 3D. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(17), 2120-2129. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424409112>
- Bratic, I., & Trifunovic, A. (2010). Mitochondrial energy metabolism and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(6-7), 961-967. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2010.01.004>
- Bucaciuc, T., Anca, M., Catalin, A., Ion, F., Violeta, C., Robi, M., Gligor, T., & Lazar, A. (2020). MetaboAge DB : a repository of known ageing-related changes in the human metabolome. *Biogerontology*, 21(6), 763-771. <https://doi.org/10.1007/s10522-020-09892-w>
- Cao, L., Guler, M., Tagirdzhanov, A., Lee, Y. Y., Gurevich, A., & Mohimani, H. (2021). MolDiscovery: Learning mass spectrometry fragmentation of small molecules. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-23986-0>
- Cao, Y., Charisi, A., Cheng, L.-C., Jiang, T., & Girke, T. (2008). ChemmineR: A compound mining framework for R. *Bioinformatics*, 24(15), 1733-1734. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn307>
- Chaleckis, R., Murakami, I., Takada, J., Kondoh, H., & Yanagida, M. (2016). Individual variability in human blood Metabolites identifies age-related differences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(16), 4252-4259. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603023113>
- Chemical Identifier Resolver (CIR) (3.108). (2019). [Software]. Alvascience. <https://www.alvascience.com/knime-cir/>
- Chu, D. H. (2012). Chapter 7. Development and Structure of Skin. En L. A. Goldsmith, S. I. Katz, B. A. Gilchrest, A. S. Paller, D. J. Leffell, & K. Wolff (Eds.), *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* (8th ed.). McGraw-Hill. <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=56021404>

- Chung, J. H., Kang, S., Varani, J., Lin, J., Fisher, G. J., & Voorhees, J. J. (2000). Decreased extracellular-signal-regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin in vivo. *The Journal of Investigative Dermatology*, 115(2), 177-182. <https://doi.org/10.1046/J.1523-1747.2000.00009.X>
- Daniel, F., Microsoft Corporation, Weston, S. & Tenenbaum, D. (2022). *doParallel: Foreach Parallel Adaptor for the «parallel» Package*. <https://CRAN.R-project.org/package=doParallel>
- Davalos, A. R., Kawahara, M., Malhotra, G. K., Schaum, N., Huang, J., Ved, U., Beausejour, C. M., Coppe, J. P., Rodoer, F., & Campisi, J. (2013). P53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *The Journal of Cell Biology*, 201(4), 613-629. <https://doi.org/10.1083/JCB.201206006>
- Deepak, K., Kumari, S., G, S., & Malla, R. R. (2020). Marine natural compound cyclo(L-leucyl-L-prolyl) peptide inhibits migration of triple negative breast cancer cells by disrupting interaction of CD151 and EGFR signaling. *Chemico-Biological Interactions*, 315(1). <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108872>
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M., & Campisi, J. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9363-9367. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.20.9363>
- Dowle, M., & Srinivasan, A. (2022). *data.table: Extension of `data.frame`*. <https://CRAN.R-project.org/package=data.table>
- Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A. A., Melnik, A. V., Meusel, M., Dorrestein, P. C., Rousu, J., & Böcker, S. (2019). SIRIUS 4: A rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nature Methods*, 16(4), 299-302. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8>
- Dührkop, K., Nothias, L. F., Fleischauer, M., Reher, R., Ludwig, M., Hoffmann, M. A., Petras, D., Gerwick, W. H., Rousu, J., Dorrestein, P. C., & Böcker, S. (2021). Systematic classification of unknown metabolites using high-resolution fragmentation mass spectra. *Nature Biotechnology*, 39(4), 462-471. <https://doi.org/10.1038/S41587-020-0740-8>
- Dührkop, K., Shen, H., Meusel, M., Rousu, J., & Böcker, S. (2015). Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(41), 12580-12585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509788112>
- Dunn, W. B., Lin, W., Broadhurst, D., Begley, P., Brown, M., Zelena, E., Vaughan, A. A., Halsall, A., Harding, N., Knowles, J. D., Francis-McIntyre, S., Tseng, A., Ellis, D. I., O'Hagan, S., Aarons, G., Benjamin, B., Chew-Graham, S., Moseley, C., Potter, P., ... Kell, D. B. (2015). Molecular phenotyping of a UK population: Defining the human serum metabolome. *Metabolomics*, 11(1), 9-26. <https://doi.org/10.1007/S11306-014-0707-1>
- Elpa, D. P., Chiu, H., Wu, S., & Urban, P. L. (2020). Skin Metabolomics. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 32(2), 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.11.009>
- Feunang, Y. D., Eisner, R., Knox, C., Chepelev, L., Hastings, J., Owen, G., Fahy, E., Steinbeck, C., Subramanian, S., Bolton, E., Greiner, R., & Wishart, D. S. (2016). ClassyFire: Automated chemical

- classification with a comprehensive, computable taxonomy. *Journal of Cheminformatics*, 8(61), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0174-y>
- Fillbrunn, A., Dietz, C., Pfeuffer, J., Rahn, R., Landrum, G. A., & Berthold, M. R. (2017). KNIME for reproducible cross-domain analysis of life science data. *Journal of Biotechnology*, 261, 149-156. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2017.07.028>
- Fitsiou, E., Pulido, T., Campisi, J., Alimirah, F., & Demaria, M. (2021). Cellular Senescence and the Senescence-Associated Secretory Phenotype as Drivers of Skin Photoaging. *The Journal of Investigative Dermatology*, 141(4S), 1119-1126. <https://doi.org/10.1016/J.JID.2020.09.031>
- Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journals of Gerontology: Series A*, 69(Suppl_1), S4-S9. <https://doi.org/10.1093/GERONA/GLU057>
- Fukusaki, E. (2014). Application of Metabolomics for High Resolution Phenotype Analysis. *Mass Spectrometry*, 3(Spec Iss 3), 736-745. <https://doi.org/10.5702/MASSSPECTROMETRY.S0045>
- Giacomoni, P. U., Declercq, L., Hellemans, L., & Maes, D. (2000). Aging of human skin: Review of a mechanistic model and first experimental data. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life*, 49(4), 259-263. <https://doi.org/10.1080/15216540050033104>
- Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., & Juarranz, Á. (2016). Chapter 1 - Anatomy and Function of the Skin. En M. R. Hamblin, P. Avci, & T. W. Prow (Eds.), *Nanoscience in Dermatology*, 1-14. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X>
- Gonzalez-Covarrubias, V., Martínez-Martínez, E., & Bosque-Plata, L. D. (2022). The Potential of Metabolomics in Biomedical Applications. *Metabolites*, 12(2), 194-226. <https://doi.org/10.3390/METABO12020194>
- Gröniger, E., Weber, B., Heil, O., Peters, N., Stäb, F., Wenck, H., Korn, B., Winnefeld, M., & Lyko, F. (2010). Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. *Public Library of Science: Genetics*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000971>
- Hall, B. J., & Hall, J. C. (Eds.). (2017). *Sauer's manual of skin diseases* (11th ed.). Wolters Kluwer.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614-636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- He, R., Wang, B., Wakimoto, T., Wang, M., Zhu, L., & Abe, I. (2013). Cyclodipeptides from Metagenomic Library of a Japanese Marine Sponge. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(12), 1926-1932. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130240>
- Höhn, A., Weber, D., Jung, T., Ott, C., Hugo, M., Kochlik, B., Kehm, R., König, J., Grune, T., & Castro, J. P. (2017). Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biology*, 11, 482-501. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2016.12.001>
- Holman, J. D., Tabb, D. L., & Mallick, P. (2014). Employing ProteoWizard to Convert Raw Mass Spectrometry Data. *Current Protocols in Bioinformatics*, 46(1), 13.24.1-13.24.9 <https://doi.org/10.1002/0471250953.BI1324S46>

- James, W. D., Berger, T. G., & Elston, D. M. (2006). *Andrews' diseases of the skin: Clinical dermatology*. (10th ed.). Saunders Elsevier.
- Jin, K. (2010). Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease*, 1(2), 72-74. <https://doi.org/10.1093/jn/119.6.952>
- Kassambara, A. (2023). *ggpubr: «ggplot2» Based Publication Ready Plots*. <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
- Kennedy, C., Bastiaens, M. T., Bajdik, C. D., Willemze, R., Westendorp, R. G. J., & Bouwes Bavinck, J. N. (2003). Effect of smoking and sun on the aging skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 120(4), 548-554. <https://doi.org/10.1046/J.1523-1747.2003.12092.X>
- Kim, H. W., Wang, M., Leber, C. A., Nothias, L. F., Reher, R., Kang, K. B., Van Der Hooft, J. J. J., Dorrestein, P. C., Gerwick, W. H., & Cottrell, G. W. (2021). NPClassifier: A Deep Neural Network-Based Structural Classification Tool for Natural Products. *Journal of Natural Products*, 84(11), 2795-2807. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00399>
- Kim, S. J., Kim, S. H., Kim, J. H., Hwang, S., & Yoo, H. J. (2016). Understanding Metabolomics in Biomedical Research. *Endocrinology and metabolism*, 31(1), 7-16. <https://doi.org/10.3803/ENM.2016.31.1.7>
- Kolarsick, P. A. J., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203-213. <https://doi.org/10.1097/JDN.0B013E3182274A98>
- Kuehne, A., Hildebrand, J., Soehle, J., Wenck, H., Terstegen, L., Gallinat, S., Knott, A., Winnefeld, M., & Zamboni, N. (2017). An integrative metabolomics and transcriptomics study to identify metabolic alterations in aged skin of humans in vivo. *BMC Genomics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3547-3>
- Lassen, J. K., Wang, T., Nielsen, K. L., Hasselstrøm, J. B., Johannsen, M., & Villesen, P. (2023). Large-Scale metabolomics: Predicting biological age using 10,133 routine untargeted LC–MS measurements. *Aging Cell*, 22(5). <https://doi.org/10.1111/ACEL.13813>
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187-195. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2006.00199.X>
- Liu, Q., Walker, D., Uppal, K., Liu, Z., Ma, C., Tran, V. L., Li, S., Jones, D. P., & Yu, T. (2020). Addressing the batch effect issue for LC/MS metabolomics data in data preprocessing. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70850-0>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.05.039>
- Losquadro, W. D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial plastic surgery clinics of North America*, 25(3), 283-289. <https://doi.org/10.1016/J.FSC.2017.03.001>
- Ludwig, M., Nothias, L.-F., Dührkop, K., Koester, I., Fleischauer, M., Hoffmann, M. A., Petras, D., Vargas, F., Morsy, M., Aluwihare, L., Dorrestein, P. C., & Böcker, S. (2020). Database-independent molecular

- formula annotation using Gibbs sampling through ZODIAC. *Nature Machine Intelligence*, 2(10), 629-641. <https://doi.org/10.1038/s42256-020-00234-6>
- Makrantonaki, E., Brink, T. C., Zampeli, V., Elewa, R. M., Mlody, B., Hossini, A. M., Hermes, B., Krause, U., Knolle, J., Abdallah, M., Adjaye, J., & Zouboulis, C. C. (2012). Identification of biomarkers of human skin ageing in both genders. Wnt signalling—A label of skin ageing? *PloS one*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0050393>
- Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2009). Androgens and ageing of the skin. *Current opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 16(3), 240-245. <https://doi.org/10.1097/MED.0B013E32832B71DC>
- Manterola, C., Quiroz, G., Salazar, P., & García, N. (2019). Metodología de los tipos y diseños de estudio más frecuentemente utilizados en investigación clínica. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 30(1), 36-49. <https://doi.org/10.1016/J.RMCLC.2018.11.005>
- Matsui, M. S., Pelle, E., Dong, K., & Pernodet, N. (2016). Biological Rhythms in the Skin. *International journal of molecular sciences*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/IJMS17060801>
- Mauro, T. M. (2012). Chapter 83. Biology of Eccrine and Apocrine Glands. En L. A. Goldsmith, S. I. Katz, B. A. Gilchrest, A. S. Paller, D. J. Leffell, & K. Wolff (Eds.), *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* (8th ed.). McGraw-Hill. <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=56047872>
- Meza-Villezcás, A., Carballo-Castañeda, R. A., Moreno-Ulloa, A., & Huerta-Saquero, A. (2022). Metabolomic Profiling of the Responses of Planktonic and Biofilm *Vibrio cholerae* to Silver Nanoparticles. *Antibiotics*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111534>
- Mohamed, S. A., & Hargest, R. (2022). Surgical anatomy of the skin. *Surgery (Oxford)*, 40(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/J.MPSUR.2021.11.021>
- Mohimani, H., Gurevich, A., Shlemov, A., Mikheenko, A., Korobeynikov, A., Cao, L., Shcherbin, E., Nothias, L.-F., Dorrestein, P. C., & Pevzner, P. A. (2018). Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06082-8>
- Nothias, L.-F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., Sarvepalli, A., Protzyuk, I., Ernst, M., Tsugawa, H., Fleischauer, M., Aicheler, F., Aksenov, A. A., Alka, O., Allard, P.-M., Barsch, A., Cachet, X., Carballo-Rodriguez, A. M., Da Silva, R. R., Dang, T., ... Dorrestein, P. C. (2020). Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods*, 17(9), 905-908. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6>
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., Caceres, M. D., Durand, S., ... Weedon, J. (2022). *vegan: Community Ecology Package*. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Paganelli, A., Righi, V., Tarentini, E., & Magnoni, C. (2022). Current Knowledge in Skin Metabolomics: Updates from Literature Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158776>

- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., De Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P. É., Li, S., & Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W388-W396. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB382>
- Panyard, D. J., Yu, B., & Snyder, M. P. (2022). The metabolomics of human aging: Advances, challenges, and opportunities. *Science Advances*, 8(42). <https://doi.org/10.1126/sciadv.add6155>
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Orešič, M. (2010). MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
- Prahl, S., Kueper, T., Biernoth, T., Wöhrmann, Y., Münster, A., Fürstenau, M., Schmidt, M., Schulze, C., Wittern, K. P., Wenck, H., Muhr, G. M., & Blatt, T. (2008). Aging skin is functionally anaerobic: Importance of coenzyme Q10 for anti aging skin care. *BioFactors*, 32(1-4), 245-255. <https://doi.org/10.1002/BIOF.5520320129>
- Quan, T., & Fisher, G. J. (2015). Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology*, 61(5), 427-434. <https://doi.org/10.1159/000371708>
- Quan, T., Shao, Y., He, T., Voorhees, J. J., & Fisher, G. J. (2010). Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(2), 415-424. <https://doi.org/10.1038/JID.2009.224>
- R Core Team. (2022). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Ren, K. (2021). *rlist: A Toolbox for Non-Tabular Data Manipulation*. <https://CRAN.R-project.org/package=rlist>
- Ressler, S., Bartkova, J., Niederegger, H., Bartek, J., Scharffetter-Kochanek, K., Jansen-Dürr, P., & Wlaschek, M. (2006). p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell*, 5(5), 379-389. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2006.00231.X>
- Rist, M. J., Roth, A., Frommherz, L., Weinert, C. H., Krüger, R., Merz, B., Bunzel, D., Mack, C., Egert, B., Bub, A., Göring, B., Tzvetkova, P., Luy, B., Hoffmann, I., Kulling, S. E., & Watzl, B. (2017). Metabolite patterns predicting sex and age in participants of the Karlsruhe Metabolomics and Nutrition (KarMeN) study. *Public Library of Science: One*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0183228>
- Rittié, L., & Fisher, G. J. (2015). Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(1). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A015370>
- Romagosa, C., Simonetti, S., López-Vicente, L., Mazo, A., Lleónart, M. E., Castellvi, J., & Cajal, S. R. Y. (2011). p16Ink4a overexpression in cancer: A tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*, 30(18), 2087-2097. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.614>

- Said, H. M., Horne, D. W., & Mock, D. M. (1990). Effect of aging on intestinal biotin transport in the rat. *Experimental Gerontology*, 25(1), 67-73. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(90\)90011-P](https://doi.org/10.1016/0531-5565(90)90011-P)
- Shafiei, M., Peyton, L., Hashemzadeh, M., & Foroumadi, A. (2020). History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. *Bioorganic Chemistry*, 104(1). <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104240>
- Sievert, C. (2020). *Interactive Web-Based Data Visualization with R, plotly, and shiny*. Chapman and Hall/CRC. <https://plotly-r.com>
- Slupsky, C. M., Rankin, K. N., Wagner, J., Fu, H., Chang, D., Weljie, A. M., Saude, E. J., Lix, B., Adamko, D. J., Shah, S., Greiner, R., Sykes, B. D., & Marrie, T. J. (2007). Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles. *Analytical Chemistry*, 79(18), 6995-7004. <https://doi.org/10.1021/AC0708588>
- Smith, R., Mathis, A. D., Ventura, D., & Prince, J. T. (2014). Proteomics, lipidomics, metabolomics: A mass spectrometry tutorial from a computer scientist's point of view. *BMC Bioinformatics*, 15(S7). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-S7-S9>
- Song, X., Narzt, M. S., Nagelreiter, I. M., Hohensinner, P., Terlecki-Zaniewicz, L., Tschachler, E., Grillari, J., & Gruber, F. (2017). Autophagy deficient keratinocytes display increased DNA damage, senescence and aberrant lipid composition after oxidative stress in vitro and in vivo. *Redox Biology*, 11, 219-230. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2016.12.015>
- Stekhoven, D. J. (2022). *missForest: Nonparametric Missing Value Imputation using Random Forest*. <https://CRAN.R-project.org/web/packages/missForest/index.html>
- Stekhoven, D. J., & Buehlmann, P. (2012). MissForest—Non-parametric missing value imputation for mixed-type data. *Bioinformatics*, 28(1), 112-118. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr597>
- Thévenot, E. A., Roux, A., Xu, Y., Ezan, E., & Junot, C. (2015). Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses. *Journal of Proteome Research*, 14(8), 3322-3335. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.5B00354>
- Victorelli, S., Lagnado, A., Halim, J., Moore, W., Talbot, D., Barrett, K., Chapman, J., Birch, J., Ogrodnik, M., Meves, A., Pawlikowski, J. S., Jurk, D., Adams, P. D., Heemst, D., Beekman, M., Slagboom, P. E., Gunn, D. A., & Passos, J. F. (2019). Senescent human melanocytes drive skin ageing via paracrine telomere dysfunction. *Journal of the European Molecular Biology Organization*, 38(23). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2019101982>
- Viña, J., Borrás, C., & Miquel, J. (2007). Theories of ageing. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life*, 59(4-5), 249-254. <https://doi.org/10.1080/15216540601178067>
- Wang, A. S., & Dreesen, O. (2018). Biomarkers of cellular senescence and skin aging. *Frontiers in Genetics*, 9(1). <https://doi.org/10.3389/FGENE.2018.00247>

- Wang, A. S., Ong, P. F., Chojnowski, A., Clavel, C., & Dreesen, O. (2017). Loss of lamin B1 is a biomarker to quantify cellular senescence in photoaged skin. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-15901-9>
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kapono, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W. T., Crüsemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., ... Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34(8), 828-837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- Wei, R., Wang, J., Su, M., Jia, E., Chen, S., Chen, T., & Ni, Y. (2018). Missing Value Imputation Approach for Mass Spectrometry-based Metabolomics Data. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19120-0>
- Weininger, D. (1988). SMILES, a Chemical Language and Information System: 1: Introduction to Methodology and Encoding Rules. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 28(1), 31-36. <https://doi.org/10.1021/ci00057a005>
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., & Vaughan, D. (2023). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>
- Wickham, H., & Henry, L. (2023). *purrr: Functional Programming Tools*. <https://CRAN.R-project.org/package=purrr>
- Willforss, J., Chawade, A., & Levander, F. (2019). NormalyzerDE: Online Tool for Improved Normalization of Omics Expression Data and High-Sensitivity Differential Expression Analysis. *Journal of Proteome Research*, 18(2), 732-740. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00523>
- Wishart, D. S., Guo, A. C., Oler, E., Wang, F., Anjum, A., Peters, H., Dizon, R., Sayeeda, Z., Tian, S., Lee, B. L., Berjanskii, M., Mah, R., Yamamoto, M., Jovel, J., Torres-Calzada, C., Hiebert-Giesbrecht, M., Lui, V. W., Varshavi, D., Varshavi, D., ... Gautam, V. (2022). HMDB 5.0: The Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D622-D631. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB1062>
- Yan, P.-S., Song, Y., Sakuno, E., Nakajima, H., Nakagawa, H., & Yabe, K. (2004). Cyclo(L -Leucyl- L -Prolyl) Produced by *Achromobacter xylosoxidans* Inhibits Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7466-7473. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7466-7473.2004>
- Yu, Z., Zhai, G., Singmann, P., He, Y., Xu, T., Prehn, C., Römisch-Margl, W., Lattka, E., Gieger, C., Soranzo, N., Heinrich, J., Standl, M., Thiering, E., Mittelstraß, K., Wichmann, H. E., Peters, A., Suhre, K., Li, Y., Adamski, J., ... Wang-Sattler, R. (2012). Human serum metabolic profiles are age dependent. *Aging Cell*, 11(6), 960-967. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2012.00865.X>

Anexos

Anexo de figuras

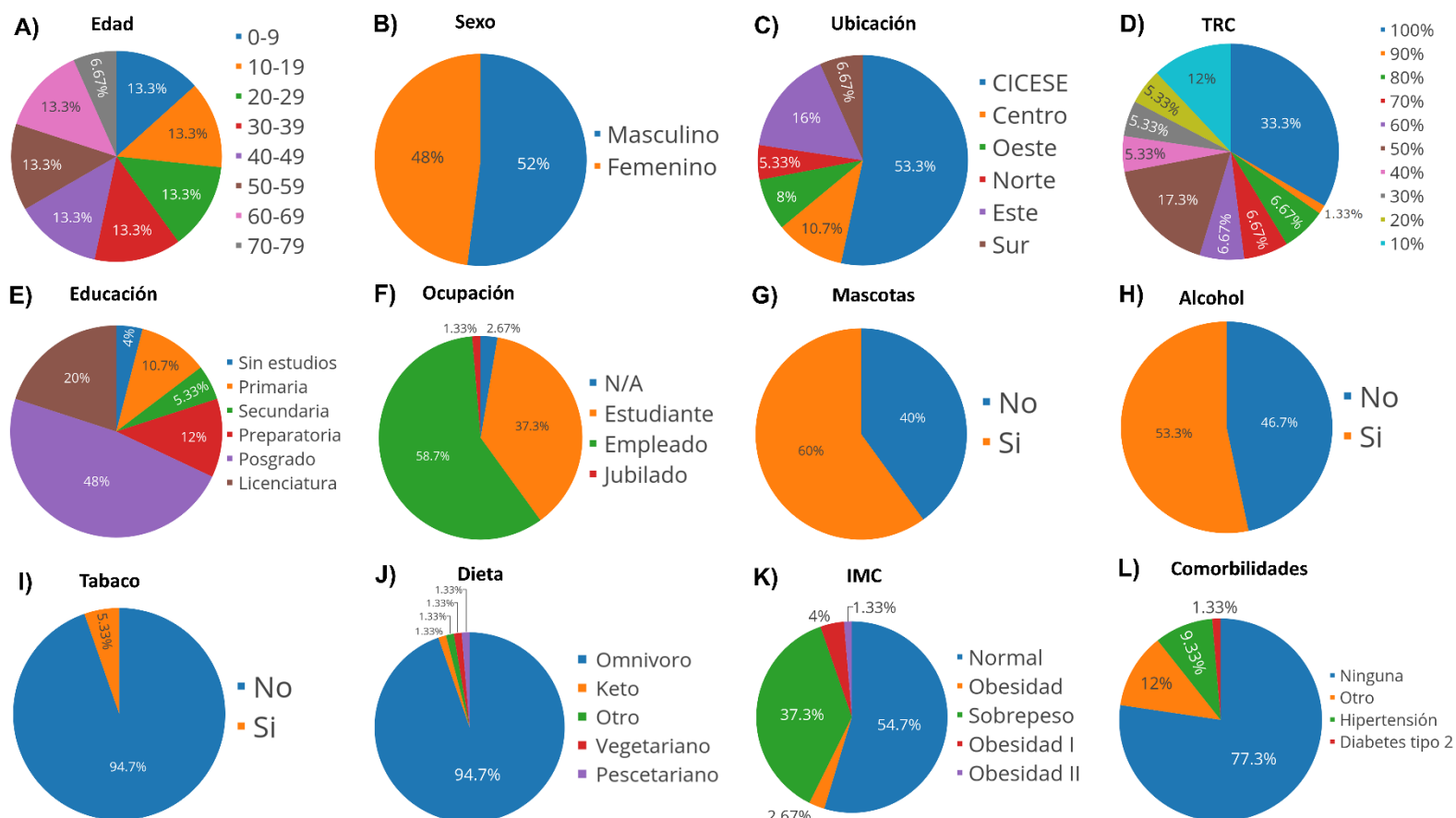


Figura 12. Metadatos de la población de estudio. A) Edad. B) Sexo. C) Ubicación. D) Tiempo relativo viviendo en la ciudad (TRC). E) Educación. F) Ocupación. G) Mascotas. H) Consumo de alcohol. I) Consumo de tabaco. J) Dieta. K) IMC L) Comorbilidades. Cálculo de TRC = [años viviendo en la ciudad] / [años de vida].

Compute

SIRIUS - Molecular Formula Identification

General

Instrument: Q-TOF

Filter by isotope pattern: ☒

MS2 mass accuracy (ppm): 10

MS/MS isotope scorer: IGNORE

Candidates stored: 10

Min candidates per ion stored: 1

Use DB formulas only

☐ COCONUT
☐ EcoCyc Mine
☐ GNPS
☒ HMDB
☐ HSDB
☐ KEGG

Possible Ionizations

☒ [M + H]⁺
☒ [M + K]⁺
☒ [M + Na]⁺

ILP

Tree timeout: 0

Compound timeout: 0

Use heuristic above m/z: 300

Use heuristic only above m/z: 650

Elements allowed in Molecular Formula

H: 0 to inf
C: 0 to inf
N: 0 to inf
O: 0 to inf
P: 0 to inf
B: 0 to auto
Si: 0 to 0
S: 0 to auto
Cl: 0 to auto
Se: 0 to auto
Br: 0 to auto
F: 0 to 0
I: 0 to 0

Select elements

ZODIAC - Network-based improvement of SIRIUS molecular formula ranking

General

Considered candidates 300m/z: 10

Considered candidates 800m/z: 50

Use 2-step approach: ☒

Edge Filters

Edge Threshold: 0.95

Min Local Connections: 10

Gibbs Sampling

Iterations: 20,000

Burn-In: 2,000

Separate Runs: 10

CSI:FingerID - Fingerprint Prediction

Fallback Adducts

☒ [M + H]⁺
☐ [M]⁺
☒ [M - H₂O + H]⁺
☒ [M + H₃N + H]⁺
☒ [M + H₂O + H]⁺
☐ [M + CH₄O + H]⁺

General

Score threshold: ☒

CSI:FingerID - Structure Database Search

Search DBs

☐ MeSH
☐ NORMAN
☐ Natural Products
☐ Plantcyc
☒ PubChem
☐ PubMed

General

Tag Lipids: ☒

CANOPUS - Compound Class Prediction

Parameter-Free! Nothing to set up here. =)

☐ Recompute already computed tasks?

Show Command Compute Cancel

Figura 13. Parámetros de Sirius utilizados para procesar datos en .MGF y .mzML. El archivo .MGF a procesar se encuentra en **Anexo C**.

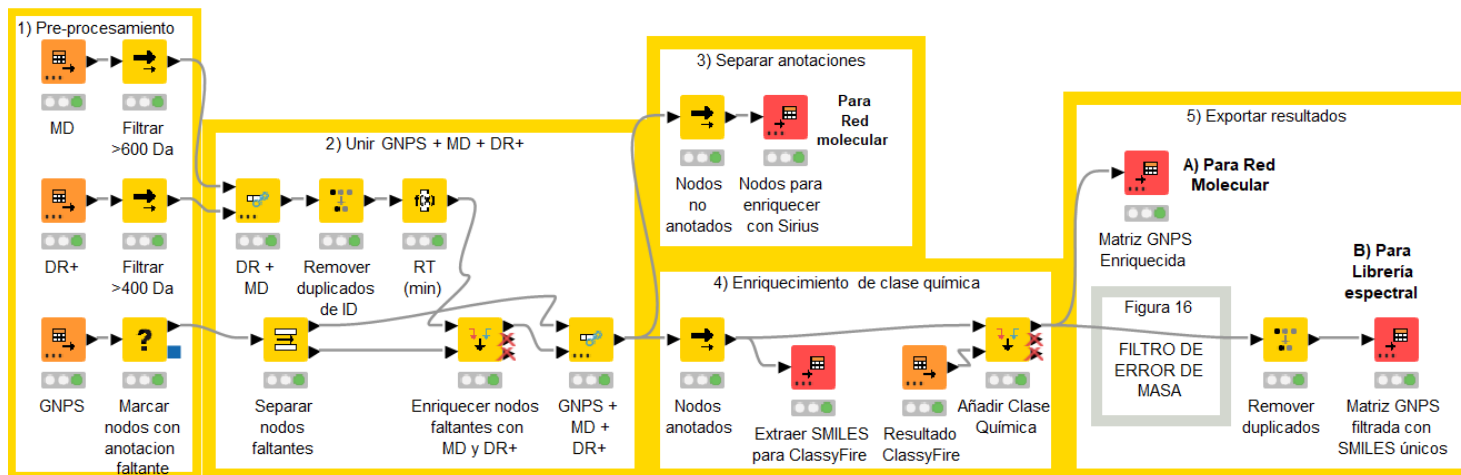


Figura 14. Flujo simplificado en KNIME para el procesamiento de la matriz de datos de la plataforma GNPS. Las matrices de entrada (GNPS, DR+ y MD) se pueden obtener de los jobs de la plataforma de GNPS, reportados en la **Tabla 8**. La matriz de entrada para “Resultado ClassyFire” se obtiene de **Anexo B**, usando la matriz resultante de “Extraer SMILES para ClassyFire” como dato de entrada. Para mayor detalle sobre el filtro de error de masa, consultar la **Figura 16, Anexo**. El flujo completo se encuentra en **Anexo C**.

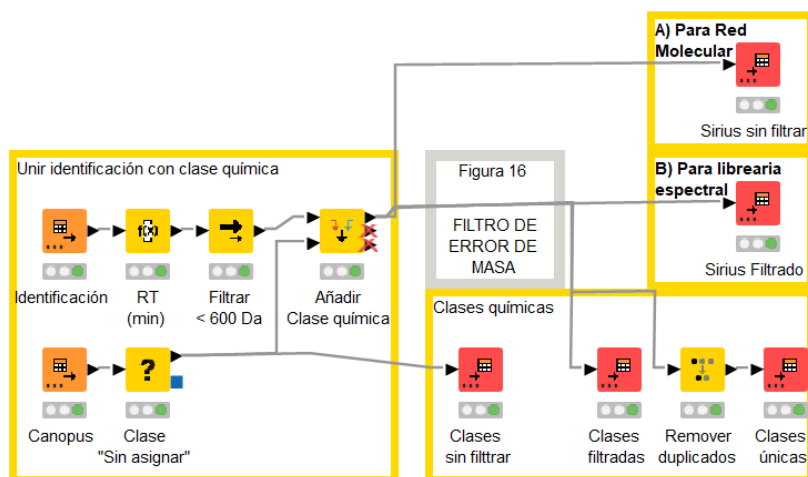


Figura 15. Flujo simplificado en KNIME para el procesamiento de la matriz de datos de la plataforma Sirius. Para mayor detalle sobre el filtro de error de masa, consultar la **Figura 16, Anexo**. Las matrices de entrada (Identificación y Canopus) y el flujo completo de KNIME se encuentra en **Anexo C**.

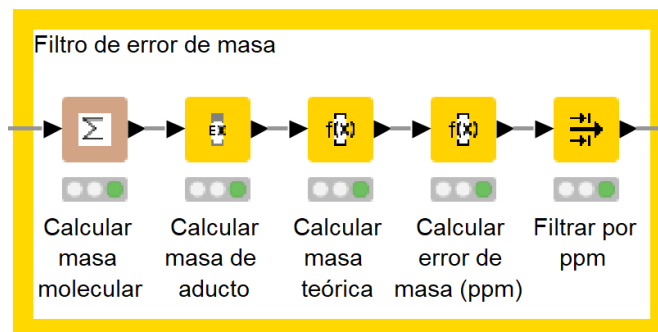


Figura 16. Flujo simplificado en KNIME para el cálculo de error de masa. Los datos para “Calcular masa de aducto” se reportan en la **Tabla 11, Anexo**. Para “Calcular masa teórica”, consultar fórmulas (1), (2) y (3). Para “Calcular error de masa (ppm)”, consultar fórmula (4). El filtro utilizado en “Filtrar por ppm” fue un rango de > 10 ppm y < -10 ppm. El flujo completo se encuentra en **Anexo C**.

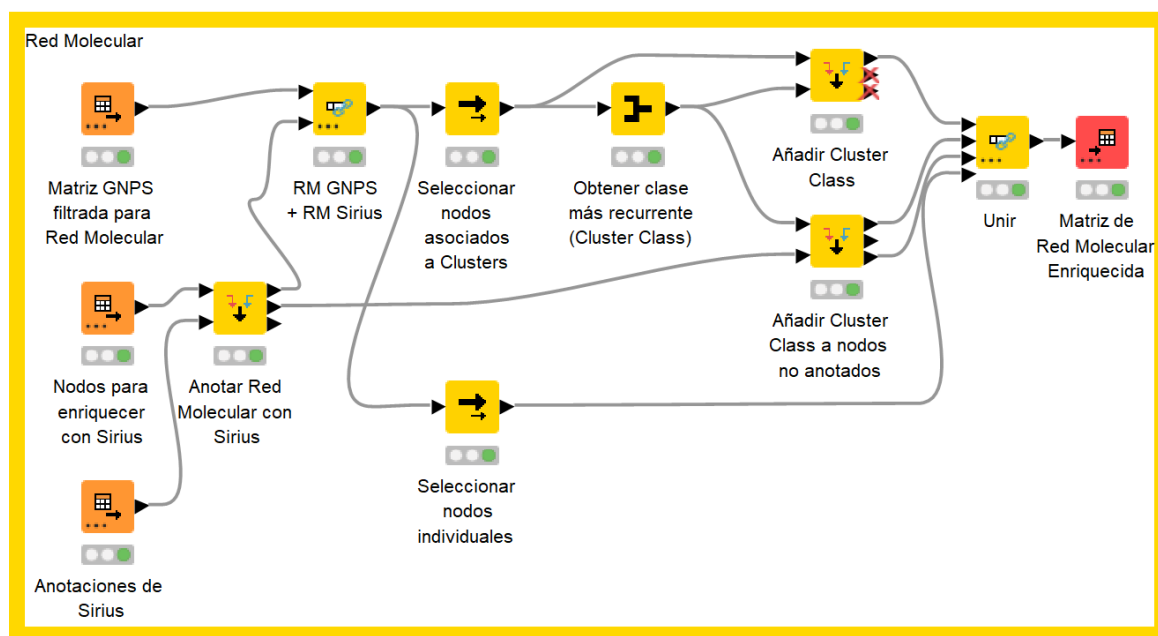


Figura 17. Flujo simplificado en KNIME para la obtención de la matriz de red molecular enriquecida, a partir de la matriz de enriquecida de GNPS y Sirius. Las matrices de entrada se pueden obtener siguiendo los flujos de KNIME de las **Figuras 12 y 13, Anexo**. El flujo completo se encuentra en **Anexo C**.

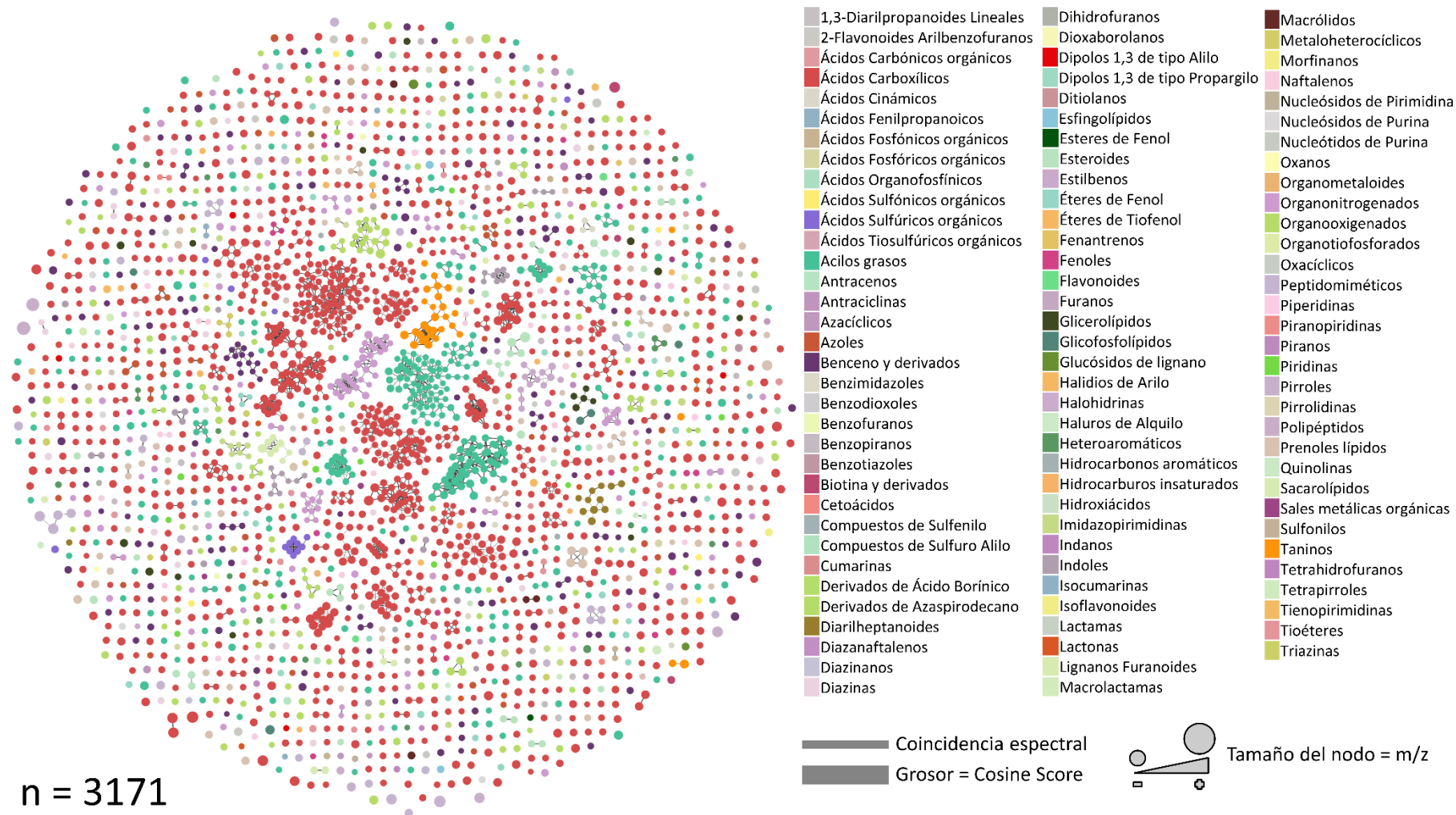


Figura 18. Red molecular de GNPS de nodos anotados (3171), distribuidos en 100 clases químicas diferentes obtenidas de CANOPUS y ClassyFire. Las clases de los nodos se asignaron conforme a la clase químicas más predominante en cada clúster. El tamaño de los nodos indica la proporción de la masa del metabolito (m/z).

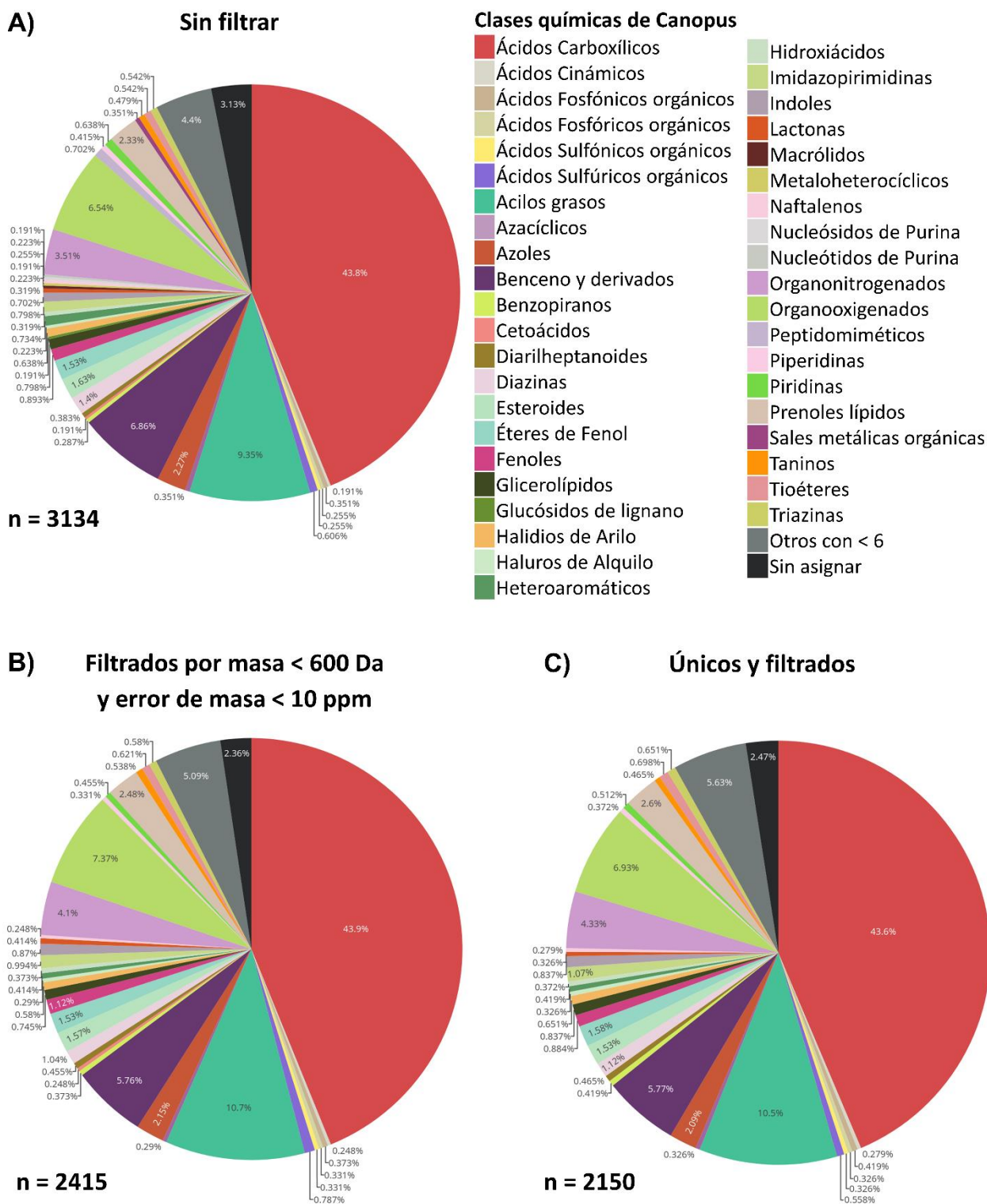


Figura 19. Comparación de resultados de clases químicas encontradas con CANOPUS por archivo MGF (proveniente de MZmine). A) Todas las clases químicas sin filtrar. B) Filtradas con masa > 600 Da y un error de masa < 10 ppm. C) Filtradas por criterios de masa y con remoción de duplicados de SMILES. Sólo se consideran clases químicas con un mínimo de 6 miembros. Todas las clases químicas que no están conformadas por al menos 6 metabolitos se agrupan en “Otros con < 6”.

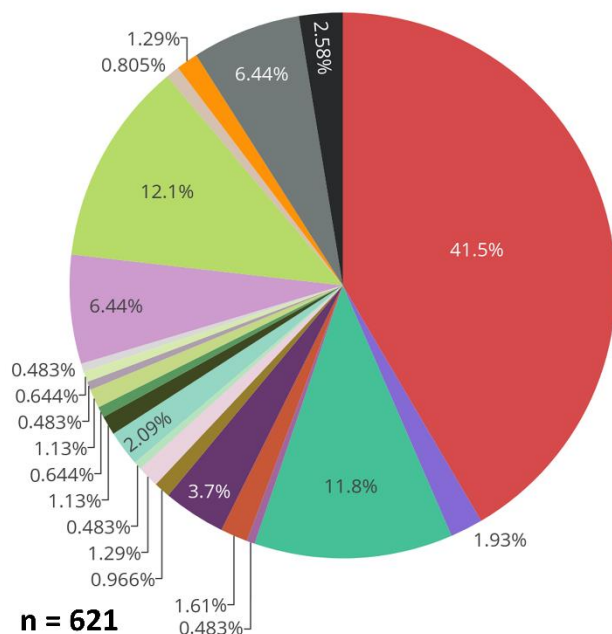
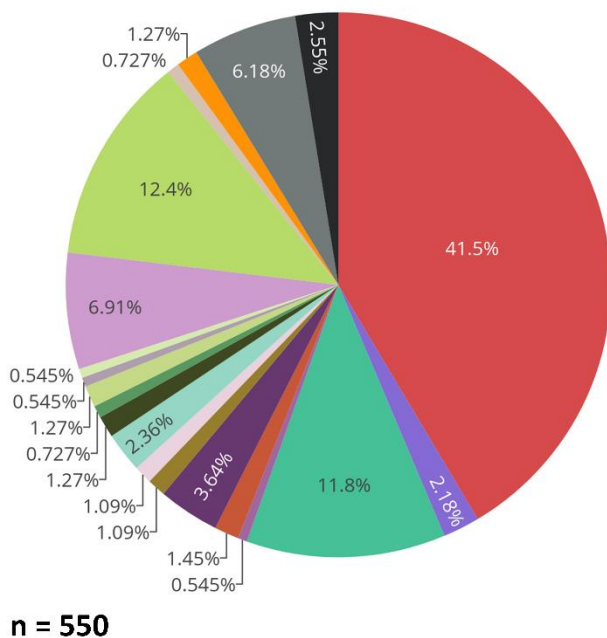
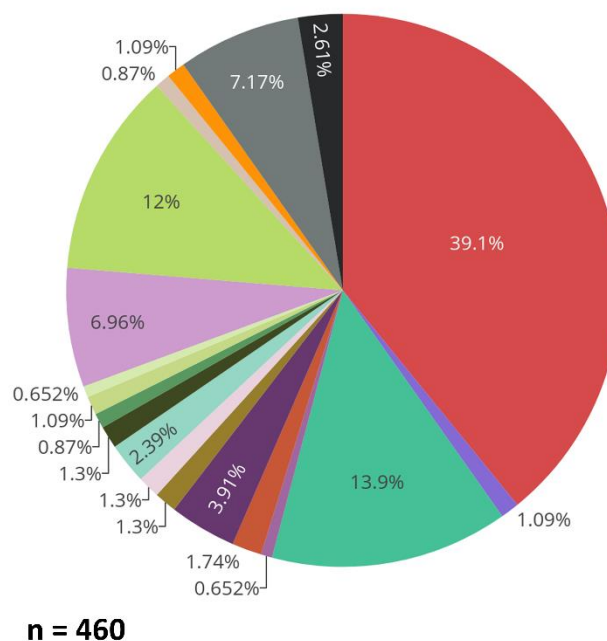
A) Sin filtrar**Clases químicas de Canopus****B) Filtrados por masa < 600 Da y error de masa < 10 ppm****C) Únicos y filtrados**

Figura 20. Comparación de resultados de clases químicas encontradas con CANOPUS por alineamiento de archivos .mzML. A) Todas las clases químicas sin filtrar. B) Filtradas con masa > 600 Da y un error de masa < 10 ppm. C) Filtradas por criterios de masa y con remoción de duplicados de SMILES. Sólo se consideran clases químicas con un mínimo de 3 miembros. Todas las clases químicas que no están conformadas por al menos 3 metabolitos se agrupan en "Otros con < 3".

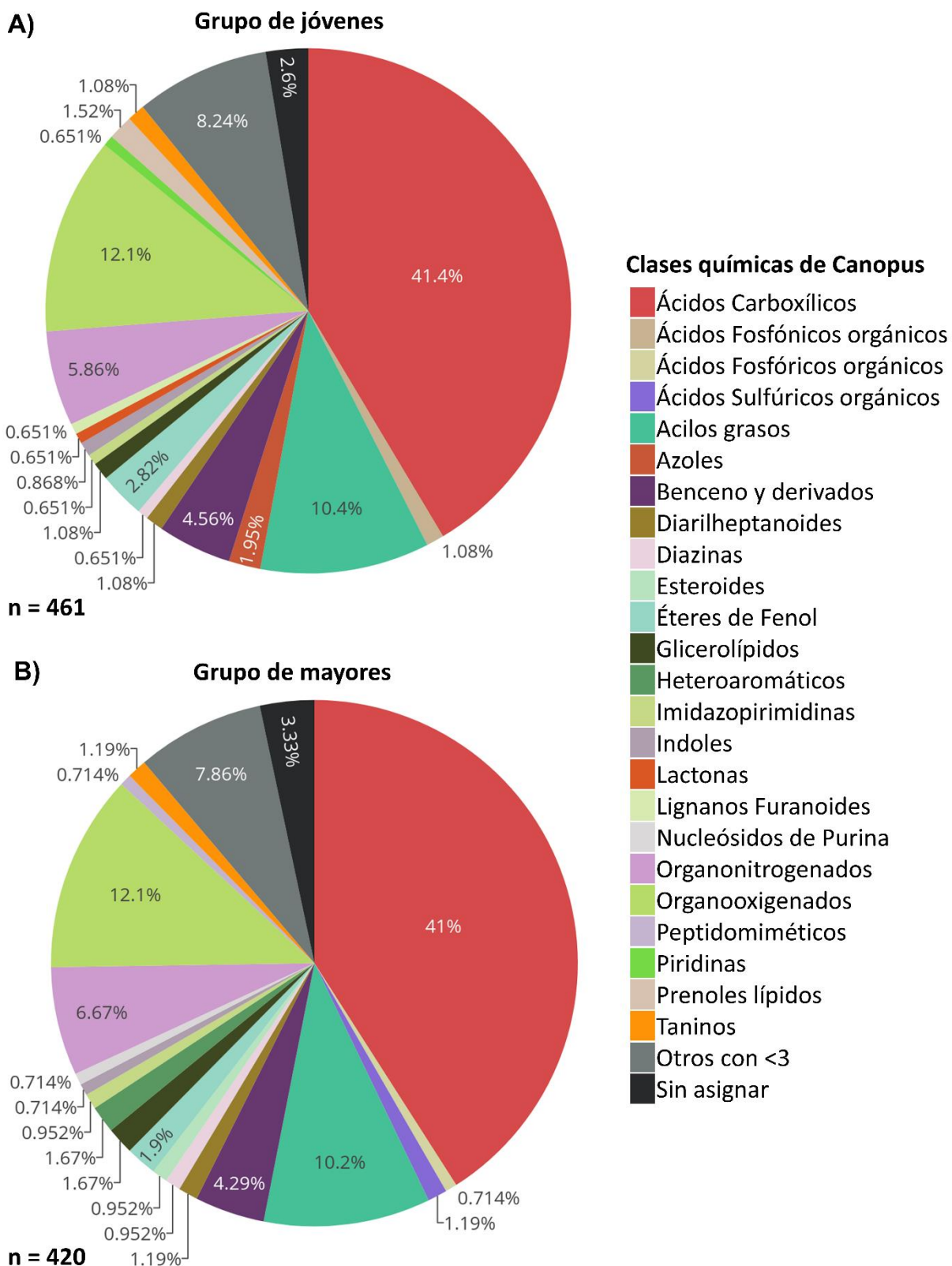


Figura 21. Distribución de clases químicas de todos los metabolitos únicos clasificados por CANOPUS, analizados por alineamiento de archivos .mzML. A) Presentes en jóvenes (37 años o menos). B) Presentes en mayores (mayores de 37 años). Se consideran únicamente metabolitos con masa < 600 Da y un error de masa < 10 ppm. Todas las clases químicas que no están conformadas por al menos 3 metabolitos se agrupan en “Otros con < 3”.

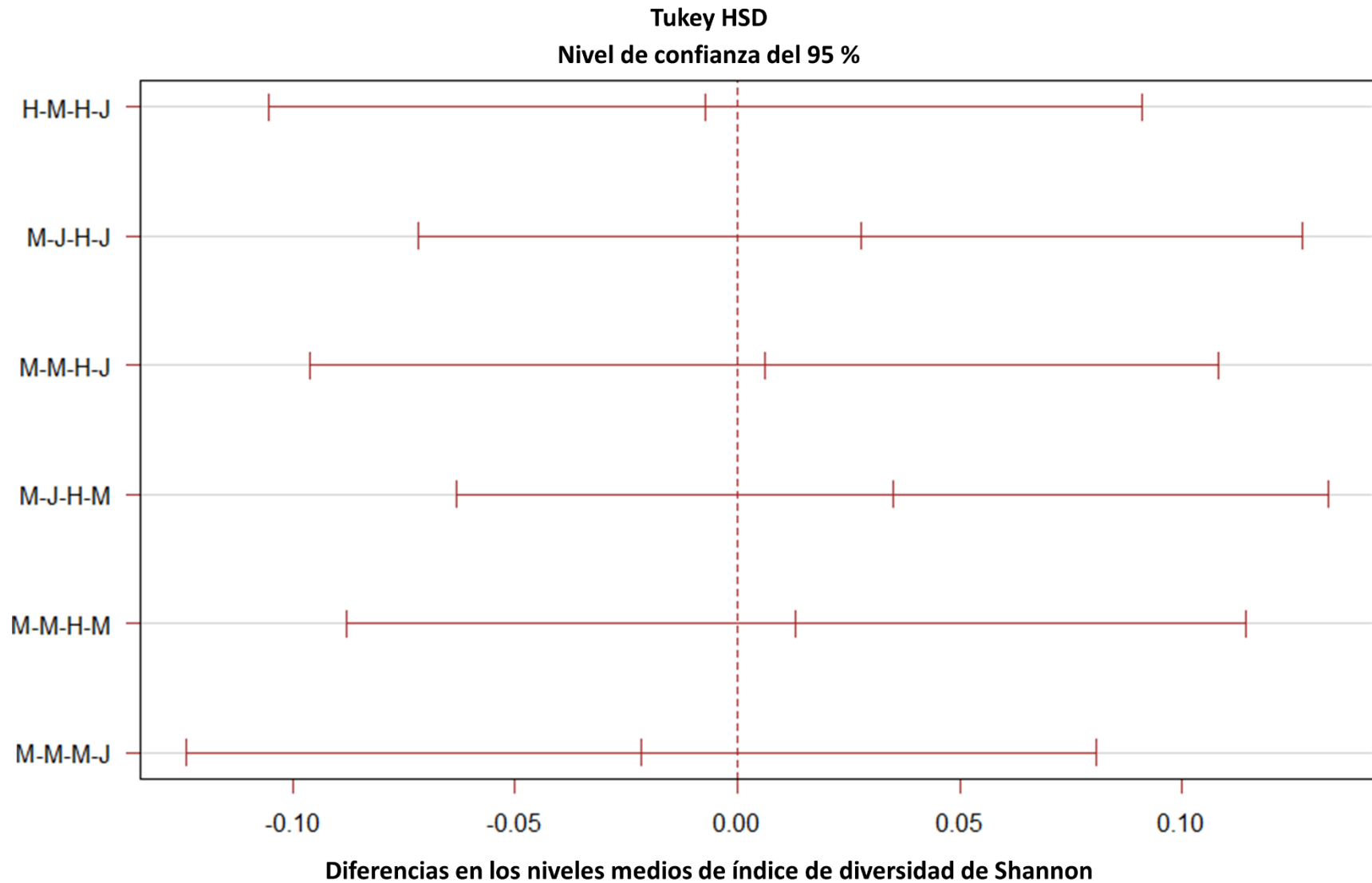


Figura 22. Intervalos de confianza de las comparaciones del índice de Shannon entre hombres y mujeres jóvenes y mayores, como resultado de la prueba Tukey HSD. El valor central de cada intervalo indica la mediana. Debido a que los intervalos de confianza se superponen, no existe ninguna comparación con una diferencia del índice de Shannon estadísticamente significativa. H-J: Hombres jóvenes; H-M: Hombres mayores; M-J: Mujeres jóvenes; M-M: Mujeres mayores.

Anexo de tablas

Tabla 8. Identificadores de los resultados de la plataforma GNPS

Aproximación	Herramienta de anotación	ID
FBMN	GNPS (Molecular Network)	a8d2d399c52740ec997e5aafc94a511f
	Dereplicator+ (DR+)	36f8e1365cac4085af775407f6d3b44e
	MolDiscovery (MD)	1c018aef212f43ff8a20ffdbe89eb5a9
CMN	GNPS (Molecular Network)	39953bebcf944b1cbc5c9d962a24e173
	Dereplicator+ (DR+)	2fb99bc99b0f43db925b37dd375b6808
	MolDiscovery (MD)	1672505b0a9042109cc59d8bdb30ca5b

Tabla 9. Comparación de resultados de anotación por la aproximación clásica (CMN) con los de la aproximación Feature-Based (FBMN). Para Sirius, CMN se refiere a la aproximación por alineamiento de archivos .mzML, y FBMN a importar el archivo .MGF proveniente de MZmine.

Plataforma	Identificaciones		Filtro	Identificaciones filtradas	
	CMN	FBMN		CMN	FBMN
GNPS	285	217	< 10 ppm	247	177
Dereplicator	148	140	> 600 Da, FDR < 5, < 10 ppm	42	31
Moldiscovery	1478	888	> 400 Da, FDR < 5, < 10 ppm	37	17
Sirius	623	3165	< 600 Da, < 10 ppm	506	2415
TOTAL	832	2606	SMILES Únicos	734	2193

Tabla 10. Parámetros utilizados en MZmine para el procesamiento de datos .mzML y obtención de .MGF.

Proceso	Parámetro	Valor
Mass Detection	Noise level (MS1)	300
	Noise level (MS2)	20
	Mass detector	Centroid
ADAP Chromatogram Builder	MS Level Filter	MS1
	Minimum consecutive scans	5
	Minimum intensity for consecutive scans	300
	Minimum absolute height	600
	m/z tolerance (scan-to-scan)	0.02 m/z / 0 ppm
Chromatogram resolving: Local minimum feature resolver	MS/MS scan pairing	Check
	MS1 to MS2 precursor tolerance (m/z)	0.02 m/z / 0 ppm
	Retention time filter	0.5 absolute (min)
	Minimum relative feature height	25%
	Minimum required signals	1
	Minimum signal intensity (relative, TIMS)	1.00%
	Dimension	Retention time
	Chromatographic threshold	85%
	Minimum search range RT/Mobility (absolute)	0.05
	Minimum relative height	1.00%
	Minimum absolute height	300
	Min ratio of peak top/edge	1
	Peak duration range (min/mobility)	0.10 - 1.00
	Minimum scans (data points)	3
¹³C isotope filter	m/z tolerance (intra-sample)	0.02 m/z / 0 ppm
	RT time tolerance	0.5 absolute (min)
	Monotonic shape	Check
	Maximum charge	1
	Representative isotope	Most intense
Join Aligner	m/z tolerance (sample-to-sample)	0.02 m/z / 0 ppm
	Weight for m/z	70
	Retention time tolerance	0.5 absolute (min)
	Weight for RT	30
	Mobility weight	1
Blanqueo: Eliminar features de muestras blanco		
Duplicate feature filter	Filter mode	Old Average
	m/z tolerance	0.006 m/z / 0 ppm
	RT tolerance	0.5 absolute (min)
	Mobility tolerance	0.008
Gap: Peak Finder	Intensity tolerance	20%
	m/z tolerance (sample-to-sample)	0.02 m/z / 0 ppm
	Retention time tolerance	0.5 absolute (min)
	Minimum scans (data points)	1

Tabla 11. Masa de aductos utilizados para el cálculo de la masa teórica.

Aducto	Masa (Da)
[M]	0
Cat	0
Unknown	1.007276
[M + H] ⁺	1.007276
[M - H] ⁺	-1.008374
[M + 2H] ⁺	1.007276
[2M + H] ⁺	1.007276
[M + O + H] ⁺	17.002191
[M + H ₂ O + H] ⁺	19.017841
[M - H ₂ O + H] ⁺	-17.00274
[M - 2H ₂ O + H] ⁺	-35.014402
[M - H ₄ O ₂ + H] ⁺	-35.014402
[M + Na] ⁺	22.98977
[M + 2Na] ⁺	22.989221
[M + K] ⁺	38.963708
[M + H ₃ N + H] ⁺	18.034374
[M - NH ₃ + H] ⁺	-15.994915
[M + NH ₄] ⁺	18.033826
[M - 3H ₂ O + H] ⁺	-53.023870
[M + ACN + H] ⁺	42.034374
[M + H - CH ₄ O] ⁺	-31.019487
[M + C ₂ H ₃ N + H] ⁺	42.033826
[M - CH ₃ NH ₂ + H] ⁺	-30.035472
[M + CH ₂ O ₂ + H] ⁺	47.012756
[M + H - C ₂ H ₆ O] ⁺	-45.035137
[M + C ₂ H ₃ N + Na] ⁺	65.023595
[M - C ₂ H ₆ O + H] ⁺	-45.035137

Tabla 12. Valores del índice de Shannon para cada metaboloma, considerando los valores de abundancia. Para cada muestra, la letra indica el sexo (H: Hombre, M: Mujer), el primer número indica la década de edad a la que pertenece (0: 0-9, 1: 10-19, 2: 20-29, 3: 30-39, 4: 40-49, 5: 50-59, 6: 60-69, 7: 70-79), y el último número indica el número de muestra dentro del mismo rango de edad.

Muestra	Shannon	Muestra	Shannon	Muestra	Shannon
H0-1	2.696341	M2-1	2.682869	H5-1	2.794331
H0-2	2.693043	M2-2	2.708736	H5-2	2.516525
H0-3	2.411947	M2-3	2.752077	H5-3	2.643855
H0-4	2.656285	M2-4	2.750435	H5-4	2.615764
H0-5	2.427627	M2-5	2.253524	H5-5	2.654063
M0-1	2.721169	H3-1	2.561597	M5-1	2.902874
M0-2	2.714941	H3-2	2.744924	M5-2	2.613573
M0-3	2.882453	H3-3	2.636656	M5-3	2.781402
M0-4	2.575151	H3-4	2.735288	M5-4	2.55584
M0-5	2.461542	H3-5	2.638597	M5-5	2.447794
H1-1	2.687290	M3-1	2.701287	H6-1	2.656662
H1-2	2.554897	M3-2	2.649574	H6-2	2.614426
H1-3	2.407424	M3-3	2.871193	H6-3	2.53401
H1-4	2.571539	M3-4	2.556911	H6-4	2.666901
H1-5	2.539056	M3-5	2.624244	H6-5	2.544398
M1-1	2.849403	H4-1	2.530133	M6-1	2.586169
M1-2	2.541051	H4-2	2.417145	M6-2	2.352826
M1-3	2.656413	H4-3	2.597458	M6-3	2.742015
M1-4	2.724218	H4-4	2.68699	M6-4	2.59835
M1-5	2.6504	H4-5	2.576309	M6-5	2.782538
H2-1	2.780322	M4-1	2.58674	H7-1	2.372712
H2-2	2.729654	M4-2	2.477938	H7-2	2.491413
H2-3	2.779633	M4-3	2.251519	H7-3	2.429853
H2-4	2.671493	M4-4	2.806835	H7-4	2.708804
H2-5	2.526161	M4-5	2.603583	M7-1	2.549154

Tabla 13. Valores del índice de Shannon para cada metaboloma, considerando conteo de metabolitos únicos por clase química. Para cada muestra, la letra indica el sexo (H: Hombre, M: Mujer), el primer número indica la década de edad a la que pertenece (0: 0-9, 1: 10-19, 2: 20-29, 3: 30-39, 4: 40-49, 5: 50-59, 6: 60-69, 7: 70-79), y el último número indica el número de muestra dentro del mismo rango de edad.

Muestra	Shannon	Muestra	Shannon	Muestra	Shannon
H0-1	2.696341	M2-1	2.682869	H5-1	2.794331
H0-2	2.693043	M2-2	2.708736	H5-2	2.516525
H0-3	2.411947	M2-3	2.752077	H5-3	2.643855
H0-4	2.656285	M2-4	2.750435	H5-4	2.615764
H0-5	2.427627	M2-5	2.253524	H5-5	2.654063
M0-1	2.721169	H3-1	2.561597	M5-1	2.902874
M0-2	2.714941	H3-2	2.744924	M5-2	2.613573
M0-3	2.882453	H3-3	2.636656	M5-3	2.781402
M0-4	2.575151	H3-4	2.735288	M5-4	2.55584
M0-5	2.461542	H3-5	2.638597	M5-5	2.447794
H1-1	2.687290	M3-1	2.701287	H6-1	2.656662
H1-2	2.554897	M3-2	2.649574	H6-2	2.614426
H1-3	2.407424	M3-3	2.871193	H6-3	2.53401
H1-4	2.571539	M3-4	2.556911	H6-4	2.666901
H1-5	2.539056	M3-5	2.624244	H6-5	2.544398
M1-1	2.849403	H4-1	2.530133	M6-1	2.586169
M1-2	2.541051	H4-2	2.417145	M6-2	2.352826
M1-3	2.656413	H4-3	2.597458	M6-3	2.742015
M1-4	2.724218	H4-4	2.68699	M6-4	2.59835
M1-5	2.6504	H4-5	2.576309	M6-5	2.782538
H2-1	2.780322	M4-1	2.58674	H7-1	2.372712
H2-2	2.729654	M4-2	2.477938	H7-2	2.491413
H2-3	2.779633	M4-3	2.251519	H7-3	2.429853
H2-4	2.671493	M4-4	2.806835	H7-4	2.708804
H2-5	2.526161	M4-5	2.603583	M7-1	2.549154

Tabla 14. Metadatos utilizados en la plataforma MetaboAnalyst para la creación del modelo lineal por edad ajustado por covariantes (género y batch). Para cada muestra, la letra indica el sexo (H: Hombre, M: Mujer), el primer número indica la década de edad a la que pertenece (0: 0-9, 1: 10-19, 2: 20-29, 3: 30-39, 4: 40-49, 5: 50-59, 6: 60-69, 7: 70-79), y el último número indica el número de muestra dentro del mismo rango de edad.

Muestra	Edad	Género	Batch	Muestra	Edad	Género	Batch	Muestra	Edad	Género	Batch
H0-1	3	Hombre	1	M2-1	24	Mujer	1	H5-1	58	Hombre	1
H0-2	9	Hombre	2	M2-2	25	Mujer	2	H5-2	51	Hombre	2
H0-3	4	Hombre	3	M2-3	25	Mujer	3	H5-3	54	Hombre	3
H0-4	5	Hombre	4	M2-4	25	Mujer	4	H5-4	53	Hombre	4
H0-5	9	Hombre	5	M2-5	24	Mujer	5	H5-5	56	Hombre	5
M0-1	9	Mujer	1	H3-1	34	Hombre	1	M5-1	55	Mujer	1
M0-2	7	Mujer	2	H3-2	32	Hombre	2	M5-2	54	Mujer	2
M0-3	7	Mujer	3	H3-3	35	Hombre	3	M5-3	54	Mujer	3
M0-4	9	Mujer	4	H3-4	39	Hombre	4	M5-4	56	Mujer	4
M0-5	8	Mujer	5	H3-5	35	Hombre	5	M5-5	52	Mujer	5
H1-1	14	Hombre	1	M3-1	36	Mujer	1	H6-1	64	Hombre	1
H1-2	13	Hombre	2	M3-2	30	Mujer	2	H6-2	62	Hombre	2
H1-3	18	Hombre	3	M3-3	38	Mujer	3	H6-3	66	Hombre	3
H1-4	12	Hombre	4	M3-4	32	Mujer	4	H6-4	63	Hombre	4
H1-5	15	Hombre	5	M3-5	37	Mujer	5	H6-5	67	Hombre	5
M1-1	16	Mujer	1	H4-1	48	Hombre	1	M6-1	65	Mujer	1
M1-2	12	Mujer	2	H4-2	45	Hombre	2	M6-2	60	Mujer	2
M1-3	13	Mujer	3	H4-3	40	Hombre	3	M6-3	64	Mujer	3
M1-4	17	Mujer	4	H4-4	46	Hombre	4	M6-4	68	Mujer	4
M1-5	18	Mujer	5	H4-5	49	Hombre	5	M6-5	67	Mujer	5
H2-1	27	Hombre	1	M4-1	43	Mujer	1	H7-1	70	Hombre	1
H2-2	26	Hombre	2	M4-2	47	Mujer	2	H7-2	74	Hombre	2
H2-3	29	Hombre	3	M4-3	40	Mujer	3	H7-3	73	Hombre	3
H2-4	29	Hombre	4	M4-4	40	Mujer	4	H7-4	74	Hombre	4
H2-5	20	Hombre	5	M4-5	40	Mujer	5	M7-1	70	Mujer	5

Tabla 15. Principales 10 metabolitos correlacionados positivamente con la edad en hombres.

Anotación	Fórmula	Masa experimental	Masa exacta	RT (min)	Nombre	Clase química	Pendiente	Intersección	Valor P
Sirius	C18H32N6O4S	429.2305	428.2205	10.87	1-Ethyl-2-(2-hydroxy-2-methyl-3-morpholin-4-ylpropyl)-3-[2-(pyridin-3-ylsulfonylamino) ethyl] guanidine	Triazinas	4.1143	-0.4667	0.000226
Sirius	C11H20O4	239.1270	216.1361	19.10	6-Pentanoyloxyhexanoic acid	Ácidos carboxílicos y derivados	3.9002	-1.0675	0.000420
Sirius	C12H14O3	207.1004	206.0942	13.64	6-(6-Oxocyclohexa-1,3-dien-1-yl)hex-5-enoic acid	Ácidos carboxílicos y derivados	3.8669	-1.1601	0.000462
Sirius	C9H19NO4	206.1387	205.1314	13.64	5-Nitrononane-2,8-diol	Ácidos carboxílicos y derivados	3.6504	-1.2950	0.000839
Sirius	C19H22O8	379.1410	378.1314	12.02	Methyl 3-[1-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-hydroxypropan-2-yl]oxy-4,5-dihydroxybenzoate	1,3-diarilpropanoides lineales	3.6212	-1.8315	0.000926
Sirius	C16H25N3O6	356.1796	355.1743	2.06	2-[(2-Methylpropan-2-yl)oxycarbonylamino]-3-[3-[(2-methylpropan-2-yl)oxycarbonyl]imidazol-4-yl]propanoic acid	Ácidos carboxílicos y derivados	3.6088	-1.4070	0.000944
Sirius	C12H25NO3	232.1910	231.1834	17.22	N-(1,3-dihydroxypropan-2-yl)nonanamide	Ácidos carboxílicos y derivados	3.5832	-1.4756	0.001014
Sirius	C10H18O2	171.1367	170.1306	16.97	Delta-Decalactone	Ácidos carboxílicos y derivados	3.5546	-2.4171	0.001122
GNPS	C19H39N2O3	343.2964	343.2960	24.32	Cocoamidopropyl betaine	Ácidos carboxílicos y derivados	3.5448	-2.4432	0.001153
Sirius	C13H25NO	212.2011	211.1936	19.86	N-cyclopropyldecanamide	Ácidos grasos	3.5049	-1.6842	0.001262

Tabla 16. Principales 10 metabolitos correlacionados negativamente con la edad en hombres.

Anotación	Fórmula	Masa experimental	Masa exacta	RT (min)	Nombre	Clase química	Pendiente	Intersección	Valor P
GNPS	C5H11NO2S	150.0586	149.0510	0.82	Methionine	Ácidos carboxílicos y derivados	-2.2694	-4.6062	0.029455
Sirius	C6H15NO3	150.1124	149.1051	0.64	Triethanolamine	Compuestos organo-nitrogenados	-2.1906	-4.7632	0.035164
Sirius	C8H12O3	157.0870	156.0786	19.76	Ethyl 4-ethoxybut-2-ynoate	Ácidos grasos	-2.7705	-4.3872	0.008952
Sirius	C7H17NO3	164.1282	163.1208	0.62	Methoxyethyldiethanolamine	Compuestos organo-nitrogenados	-3.2708	-2.2936	0.002398
Sirius	C4H9FN4O2	165.0790	164.0709	14.03	N-[(methoxymethylamino) carbamoylamino]methanimidoyl fluoride	Haluros de alquilo	-2.4707	-5.0601	0.018579
GNPS	C9H10O5	181.0499	198.0528	12.60	Syringic acid	Benceno y derivados sustituidos	-2.2121	-4.7208	0.033515
Sirius	C10H21NO2	188.1641	187.1572	16.99	2-Aminodecanoic acid	Ácidos carboxílicos y derivados	-2.3953	-4.8122	0.022135
Sirius	C13H18O	191.1431	190.1357	16.41	3-(1-Methylene-2-methylallyl)-5,5-dimethyl-2-cyclohexene-1-one	Compuestos organo-oxigenados	-2.4629	-5.0770	0.018925
Sirius	C8H13FO4	193.0869	192.0797	22.57	2-Fluorooctanedioic acid	Ácidos grasos	-2.2645	-5.4916	0.029940
Sirius	C11H12O3	193.0868	192.0786	23.19	Methyl p-methoxycinnamate	Ácidos cinámicos y derivados	-3.2085	-3.3196	0.002880

Tabla 17. Principales 10 metabolitos correlacionados positivamente con la edad en mujeres.

Anotación	Fórmula	Masa experimental	Masa exacta	RT (min)	Nombre	Clase química	Pendiente	Intersección	Valor P
Sirius	C5H5N3O	124.0504	123.0432	2.74	1,5-Dihydroimidazo[1,5-b]pyrazol-6-one	Diazinas	2.1776	-5.1897	0.037115
GNPS	C7H7NO2	138.0539	137.0476	0.63	Trigonelline	Benceno y derivados sustituidos	3.6106	-1.8603	0.001057
Sirius	C5H10N2O2	153.0639	130.0742	1.00	Glutaramide	Ácidos carboxílicos y derivados	2.9593	-3.4911	0.005840
Sirius	C10H16O2	169.1225	168.1150	20.15	Chrysanthemic acid	Ácidos carboxílicos y derivados	2.8299	-4.1920	0.008061
Sirius	C9H15NO2	170.1160	169.1102	1.49	1-(2-Methoxyethylamino)hex-5-yn-2-one	Piperidinas	2.6366	-4.3460	0.012916
Sirius	C8H16O4	177.1115	176.1048	8.34	2,3-Dihydroxypropyl pentanoate	Ácidos grasos	2.3161	-4.9142	0.027284
Sirius	C6H9N3O2	178.0588	155.0694	0.61	2-cyano-N"-propanoylacetohydrazide	Azoles	2.2331	-5.0808	0.032847
Sirius	C9H9NO3	180.0659	179.0582	3.97	Hippuric Acid	Ácidos carboxílicos y derivados	2.0655	-5.4034	0.047266
Sirius	C4H10N6O	181.0797	158.0916	5.40	[1-(2-Methoxyethyl)tetrazol-5-yl]hydrazine	Azoles	2.1828	-5.5807	0.036676
Sirius	C11H16O3	197.1170	196.1099	11.42	4-Oxoundec-9-ynoic acid	Dihidrofuranos	2.1105	-5.4333	0.042899

Tabla 18. Principales 10 metabolitos correlacionados negativamente con la edad en mujeres.

Anotación	Fórmula	Masa experimental	Masa exacta	RT (min)	Nombre	Clase química	Pendiente	Intersección	Valor P
Sirius	C ₉ H ₁₀	119.0856	118.0782	25.25	Isopropenylbenzene	Hidrocarburos aromáticos	-2.4123	-4.7160	0.021918
Sirius	C ₉ H ₁₁	119.0856	119.0860	25.74	Propan-2-ylcyclohexatriene	Lípidos prenoles	-2.7867	-3.8941	0.008979
Sirius	C ₈ H ₁₄ NOS	173.0862	173.0874	1.12	1-[2-(ethylthio)ethyl]-2-pyrrolidinone	Piperidinas	-2.0833	-5.3700	0.045503
Sirius	C ₁₃ H ₁₆ O ₃	221.1178	220.1099	26.72	1-(4-Propoxyphenyl)butane-1,3-dione	Esteres fenoles	-2.1693	-5.2058	0.037793
Sirius	C ₁₀ H ₁₃ FN ₄ O	225.1159	224.1073	14.56	1-Ethyl-5-(3-fluoropropyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one	Azoles	-2.0788	-5.7799	0.045920
Sirius	C ₉ H ₁₉ N ₅ O ₃	246.1545	245.1487	13.11	Glycyl-DL-ornithyl-glycinamide	Azoles	-2.1891	-5.2819	0.036169
Sirius	C ₁₄ H ₂₂ O ₄	255.1595	254.1518	15.73	1-[2-[2-(2-but-2-ynoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]but-2-yne	Ácidos carboxílicos y derivados	-2.0857	-5.7670	0.045253
Sirius	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	281.1393	280.1310	25.64	Cyclopentadecane-1,4,7,10,13-pentone	Ácidos carboxílicos y derivados	-2.3483	-4.9626	0.025346
Sirius	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	281.1392	280.1310	25.75	(3S,3aR,4S,6E,9Z,11R,11aS)-4,11-dihydroxy-3,6,10-trimethyl-3,3a,4,5,11,11a-hexahydrocyclodeca[b]furan-2,8-dione	Ácidos carboxílicos y derivados	-2.7676	-3.9378	0.009411
Sirius	C ₁₆ H ₂₇ NO ₃	282.2036	281.1990	15.31	2-(Tetradeca-2,4-dienoylamino)acetic acid	Ácidos carboxílicos y derivados	-2.1591	-5.3401	0.038615

Tabla 19. Paquetes de R utilizados para la generación de todos los resultados descritos en la metodología.

Paquete	Versión	Referencia	Uso
ChemmineR	3.50.0	Cao et al., 2008	Habilita la función <code>read.SDFset</code> , para la lectura de los resultados de ClassyFire en formato sdf.
data.table	1.14.6	Dowle & Srinivasan, 2022	Habilita la función <code>fread</code> , una manera más eficiente de leer tablas (particularmente para leer la tabla de MS1 normalizada por <code>'normalyzer'</code>).
doParallel	1.0.17	Daniel et al., 2022	Habilita las funciones <code>'detectCores'</code> y <code>'registerDoParallel'</code> , necesarios para registrar un servidor paralelo <code>'foreach'</code> para ejecutar la función <code>'missForest'</code> .
dplyr	1.1.3	Wickham et al., 2023	Habilita el operador <code>%>%</code> , útil para concatenar operaciones en una misma línea de código.
ggpubr	0.6.0	Kassambara, 2023	Habilita la función <code>'stat_compare_means'</code> para agregar etiquetas de las comparaciones de medias entre grupos (cohortes), para el gráfico de tipo "Raincloud", esto como un argumento complementario de la función <code>'ggplot'</code> .
missForest	1.5	Stekhoven, 2022; Stekhoven & Buehlmann, 2012	Habilita la función <code>'missForest'</code> , utilizada para imputar la matriz normalizada por la función <code>'normalyzer'</code> .
NormalyzerDE	1.16	Willforss et al., 2019	Habilita la función <code>'normalyzer'</code> , necesaria para normalizar la matriz de MS1.
plotly	4.10.2	Sievert, 2020	Habilita las funciones <code>'plot_ly'</code> y <code>'ggplot'</code> , utilizadas para la creación de gráficos.
purrr	1.0.1	Wickham & Henry, 2023	Habilita la función <code>'map'</code> , utilizada para aplicar una función a cada elemento de una lista (en este caso, la función <code>'Tests_Cohort'</code> definida dentro del mismo código).
rlist	0.4.6.2	Ren, 2021	Habilita la función <code>'list.filter'</code> , que filtra el resultado obtenido por la función <code>'Tests_Cohort'</code> (definida dentro del mismo código) para que solo se retengan las filas (clases químicas) donde el valor de significancia (p-value) sea menor que 0.05.
vegan	2.6-4	Oksanen et al., 2022	Habilita la función <code>'diversity'</code> , utilizada para calcular el índice de diversidad de Shannon.

Anexo A. Documentos utilizados para el reclutamiento de los sujetos de estudio.**CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR COMO SUJETO DE INVESTIGACION**

Se le solicita su consentimiento para participar en el estudio de investigación. La participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la siguiente información y siéntase libre de preguntar cualquier cosa que no entienda antes de decidir si desea participar. Los investigadores citados a continuación responderán sus preguntas.

EQUIPO DE INVESTIGACION

Investigador líder:

Aldo Moreno Ulloa

Investigador

Carretera Tijuana-Ensenada 3918, Zona Playitas, 22860 Ensenada, B.C.

PROPOSITO DEL ESTUDIO

El propósito del estudio de investigación es evaluar la presencia de sustancias químicas en la piel en personas de diferentes edades. Desde una perspectiva, esto indicaría como son las sustancias químicas de la piel en diferentes edades hasta los 80 años.

TEMAS***Requerimientos***

Usted es elegible para participar en este estudio si cumple con los siguientes requisitos:

- 1. Edad menor a 80 años**
- 2. Cualquier género**
- 3. Otorga su consentimiento informado**

Y, no es elegible si presenta alguno de los siguientes puntos:

- 1. Embarazada**
- 2. Síntomas y/o diagnóstico de enfermedades adquiridas por contacto con una persona enferma o por otro medio como el aire, los alimentos, el agua, entre otros, o causadas por microorganismos, virus, bacterias u hongos.**
- 3. Enfermedades del sistema inmunitario donde el cuerpo ataca a los órganos sanos propios porque los confunde con órganos extraños.**
- 4. Cáncer**
- 5. Enfermedades de la piel; dermatitis atópica, psoriasis, rosácea, eczema, etc.**

PROCEDIMIENTOS

El procedimiento consiste en la toma de una muestra en la superficie en diferentes puntos de la piel utilizando un hisopo de algodón empapado en una solución a cantidades iguales de agua y etanol, sin dolor y no invasiva.

Previo a la toma de la muestra, todos los participantes deberán pasar por una fase inicial de estabilización, en la que se solicita a los participantes que utilicen un jabón neutro para la ducha y una crema corporal durante 2 semanas, mismos que serán proveídos por el equipo de investigación. Posterior a la fase de estabilización, se continuará con una fase de vigilancia con duración de 1 semana, en la que los participantes deberán abstenerse del uso de medicamentos, cosméticos (incluido bloqueador solar, perfumes o maquillaje), productos de higiene (que no sean los proveídos anteriormente) y consumo de bebidas alcohólicas, tabaco y cualquier narcótico o sustancia psicoactiva. Durante este periodo, los participantes deberán continuar utilizando el jabón y la crema proveídos en la fase de estabilización.

Los puntos de la piel a muestrear son los siguientes: frente, cuello (debajo de la barbilla), espalda superior (entre el dorso y el cuello), brazo (bíceps), antebrazo, palma externa de la mano, muslo y pierna (Figura 1).

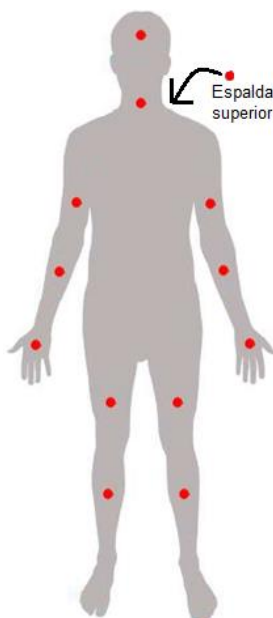


Figura 1. Sitios del cuerpo de la posible recolección de la muestra (hisopo de algodón) y toma de fotografías.

Esta muestra será procesada y analizada –durante 6 meses- en el Departamento de Innovación Biomédica del CICESE empleando herramientas analíticas e informáticas de última generación con el fin de identificar cuáles son las sustancias que componen a las muestras y como estas sustancias se relacionan con las muestras provenientes de otros participantes.

Como parte de la investigación se le preguntarán sus datos de edad, género, algunos hábitos de consumo (alimentación, cosméticos y productos de higiene que utiliza) y se medirá su talla y peso. También se tomará una foto con acercamiento a los sitios de muestreo en la piel, en la que no se expondrá el rostro del individuo. Los datos que se capturen se utilizarán para fines científicos y serán resguardados en discos de almacenamiento en CICESE, respetando su privacidad.

RIESGOS E INCOMODIDADES

El estudio implica el uso de un hisopo de algodón empapado en agua y etanol de alta pureza sobre la piel, lo cual no pone en riesgo su vida. No obstante, en algunos casos el alcohol puede provocar irritación local leve pero reversible de forma natural.

BENEFICIOS

Beneficios de la Investigación

Su participación beneficiará al ámbito científico y en particular nos ayudará a comprender mejor cuáles son los cambios en la composición química de la piel en diferentes edades hasta los 80 años.

Beneficios a otros y a la Sociedad

Esperamos que lo que aprendamos aquí nos permita evaluar el estado de salud de una persona en diferentes edades hasta los 80 años a través de la piel.

COMPENSACIÓN

Compensación por la Participación

Usted no recibirá ningún pago por su participación en este estudio. Sin embargo, recibirá un reconocimiento en agradecimiento por apoyar esta investigación.

TERMINACION DEL ESTUDIO Y CONSECUENCIAS

Usted es libre de dejar el estudio en cualquier momento sin que esto implique ningún tipo de consecuencia hacia usted. **Si usted decide dejar el estudio deberá avisar al Dr. Aldo Moreno Ulloa inmediatamente.**

CONFIDENCIALIDAD

Identificación de los datos

Para la recolección de información se utilizará una computadora. Solamente el investigador principal y los estudiantes que el investigador autorice tendrán acceso a toda información recolectada y proveniente del análisis de los datos. No obstante, los datos pueden ser usados para la publicación de algún artículo en medios digitales, pero no se revelará su nombre. Los datos estarán resguardados en las instalaciones de CICESE.

Acceso a Datos

Cualquier información derivada de este proyecto de investigación que muestre su identidad no será voluntariamente revelada por el equipo de investigación quienes tendrán acceso a los datos sin su consentimiento explícito. Publicaciones y/o presentaciones que resulten de esta investigación no incluirán información que revele su identidad.

Retención de los datos

El equipo de investigación mantendrá los datos que resulten de la investigación. Otros investigadores pueden tener acceso a los datos para futuras investigaciones.

Permiso para tomar fotografías

Debido al objetivo del estudio que propone hacer una copia tridimensional de la zona de la piel (**Figura 1**) para puntualizar la ubicación anatómica de los metabolitos detectados. Por favor indique a continuación si da su permiso para tomar fotografías de la zona de la piel a evaluar, en caso contrario (usted aún puede participar en la investigación): ____ Sí ____ No ____ Sus iniciales

Permiso para compartir datos con la audiencia en esta área

Pensando en los beneficios a la comunidad científica, el equipo de investigación probablemente en un futuro le gustaría compartir los datos (edad, genero, talla, peso y fotografías de la piel) capturados durante el estudio –excluyendo los que pudiesen revelar su identidad- con la audiencia de investigadores en esta área. Por favor indique a continuación si da su permiso para compartirlas (en caso contrario, usted aún puede participar en la investigación): ____ Sí ____ No ____ Sus iniciales

SI USTED TIENE ALGUNA PREGUNTA

Si tiene comentarios, dudas, preocupaciones con respecto a la forma en la que se llevará a cabo la investigación por favor contacte al equipo de investigación listado al inicio del presente documento.

ACUERDO DE PARTICIPACION VOLUNTARIA

Usted no debería firmar este documento a menos que lo haya leído. **La participación en este estudio es voluntaria.** Usted puede suspender su participación en cualquier momento sin sanciones ni pérdida de beneficios a los que él o ella tendría derecho. Su decisión no afectará su relación futura con CICESE. Su firma indica que usted ha leído la información en este documento de consentimiento y ha tenido la oportunidad de hacer cualquier pregunta que tenga sobre el estudio.

Al firmar este documento, usted:

- Se compromete a utilizar los productos de higiene proporcionados (jabón y crema corporal) en el intervalo indicado.
- Autoriza que se tome una muestra de su piel de acuerdo con el procedimiento establecido.
- Facilitará al equipo de investigación de información personal que sea de utilidad para el estudio.
- Seguirá las indicaciones pertinentes al estudio que el equipo de investigación le solicite.
- En caso de que no pueda seguir o falte involuntariamente a alguna indicación, que exista alguna complicación con el uso de los productos de higiene, o que suceda cualquier eventualidad que le dificulte continuar con el estudio, deberá notificarlo al equipo de investigación.

Este documento se extiende por duplicado y usted como participante del estudio recibirá una copia.

Estoy de acuerdo en participar en el estudio.

Firma y nombre del participante

Fecha

Firma y nombre del Dr. Aldo Moreno Ulloa

Fecha



¿Te gustaría
apoyar a la
ciencia en tu
ciudad?

Si gozas de buena salud,
¡puedes participar!

Estudio para todas las edades:

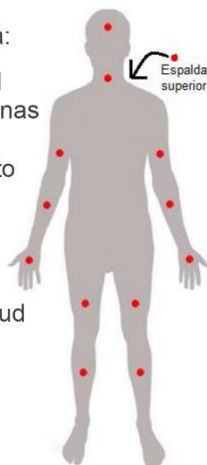
Estamos buscando personas de cualquier edad que **no padezcan de ninguna enfermedad** y estén dispuestos a participar en un **rápido y sencillo experimento** indoloro de no más de **10 minutos**.

En nuestro estudio buscamos entender cuáles son los cambios que suceden en el cuerpo relacionados con el envejecimiento a través de la piel.

El experimento consiste en frotar un cotonete (hisopo) en distintos puntos de la piel (como se muestra en la imagen), el cual será analizado en el laboratorio para entender las diferencias en los participantes de menor edad con los de edad avanzada.

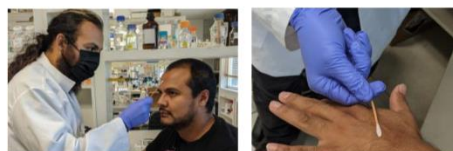
Previo a la toma de la muestra, se le pedirá:

- Utilizar un jabón neutro y crema corporal (otorgado por el equipo) durante 3 semanas
- No fumar, beber o utilizar cosméticos al menos 1 semana previa al experimento
- Firmar una carta de consentimiento informado
- Contestar un cuestionario sobre datos antropométricos, socioeconómicos, hábitos de consumo (alimentación) y salud



Los participantes recibirán:

- Reconocimiento de agradecimiento



Ubicación

- ¡A domicilio! Nosotros mismos iremos hasta su hogar para tomar la muestra

¿Es un candidato elegible?

- Menor a 80 años
- Cualquier género
- No padece de ninguna enfermedad (crónica, infecciosa, autoinmune o cáncer)
- No tiene problemas evidentes de la piel (dermatitis, psoriasis, rosácea, eczema)
- No está embarazada

Si desea participar, o tiene alguna duda sobre los requisitos, llame o envíe un correo electrónico a un miembro del equipo:

- Dr. Aldo Moreno Ulloa
- Responsable del estudio
- Departamento de Innovación Biomédica
- [Redacted]
- [Redacted]

- Ing. Jhordan Ojeda González
- Corresponsal
- Departamento de Innovación Biomédica
- [Redacted]
- [Redacted]

¡Gracias por participar!



Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada
Carretera Tijuana-Ensenada 3918, Zona Playitas, 22860 Ensenada, B.C.



Cuestionario para estudio de la piel

ID _____

Marque con una **X** la opción que aplique para usted

Datos demográficos

Sexo ☐ Hombre ☐ Mujer Edad: _____ años
 Nacionalidad ☐ Mexicana ☐ Otro Tiempo en Ensenada: _____ años

Datos antropométricos

Altura (m) _____ metros Peso (kg) _____ kilos

Datos socioeconómicos

Educación ☐ Sin estudios ☐ Secundaria ☐ Licenciatura
 (cursando o últimos ☐ Primaria ☐ Preparatoria ☐ Posgrado
 concluidos)
 Ocupación ☐ Empleado ☐ Estudiante ☐ Persona del hogar
☐ Desempleado ☐ Jubilado ☐ No aplica (N/A)
 Mascotas ☐ Si ☐ No

Dirección (Colonia) _____

Hábitos de consumo

Tabaco ☐ Si ☐ No Alcohol ☐ Si ☐ No
 Dieta ☐ Omnivoro (Todo) ☐ Vegetariano ☐ Keto
☐ Pescetariano ☐ Vegano ☐ Otro

Datos de salud

Enfermedades que ☐ Enfermedad ☐ Insuficiencia ☐ Diabetes ☐ Hipertensión
 padece ☐ autoinmune ☐ cardíaca ☐ tipo 2
 Otro ☐ ¿Cuál? _____
 Medicamentos ☐ ¿Cuál? _____
 Suplementos ☐ ¿Cuál? _____

Anexo B. Códigos en R utilizados en la metodología

Procesamiento de resultados de ClassyFire

```

library(dplyr)
library(ChemmineR)

#Set Variables
WD <- #"Directorio de trabajo"
setwd(WD)

smiles <- read.csv(SMILES.csv")

#Make TSV to analyze in Classyfire
write.table(smiles, file = "../SMILES_ClassyFire.tsv",
            row.names=FALSE, sep="\t",col.names=TRUE)

#Cargar SMILES_ClassyFire.tsv en Classyfire
#Cuando el análisis termine, descargar archivo en formato SDF
#http://classyfire.wishartlab.com

#Leer resultado de ClassyFire en formato SDF.
sdfset <- read.SDFset("11227002.sdf")

blockmatrix <- datablock2ma(datablocklist=datablock(sdfset))
metID <- sdfid(sdfset)
blockmatrix <- cbind(metID,blockmatrix)
blockmatrix <- as.data.frame(blockmatrix[-1,])

#Insertar Superclase
Superclass <- sub(" __ > <Superclass>", "",blockmatrix$Superclass)
blockmatrix$Superclass <- Superclass

#Insertar Clase
Class <- sub(" __ > <Class>", "",blockmatrix$Class)
blockmatrix$Class <- Class

#Insertar Subclase
Subclass <- sub(" __ > <Subclass>", "",blockmatrix$Subclass)
blockmatrix$Subclass <- Subclass

#Generar matriz final
Classyfire_result <- blockmatrix %>%
select(metID, Superclass, Class, Subclass)
rownames(Classyfire_result) <- NULL
Classyfire_result <- merge(Classyfire_result,smiles, by ="metID")

#Exportar resultados
write.csv(Classyfire_result, file = "ClassyFire.csv",
          row.names = FALSE, col.names = TRUE)

```

Normalización e imputación de tabla de cuantificación (MS1) obtenida por MZmine

```

library(data.table)
library(NormalyzerDE)
library(doParallel)
library(missForest)

# Establecer y crear directorios de trabajo
WD <- #"Directorio de trabajo"
setwd(WD)
dir.create("1. Normalyzer")
dir.create("2. MetImp")
dir.create("3. MetaboAnalyst")

#Leer tabla de cuantificación de MS1
MS1 <- read.csv("MS1.csv")

Feature <- MS1[,1]
MS1 <- MS1[2:86]

matrix <- data.frame(Sample = sort(colnames(MS1)),
  Group = c(rep("Young", 18), "Old", "Young", rep("Old", 19), rep("Young", 17),
    "Old", "Young", "Young", rep("Old", 16), rep("QC", 10)))

##### Normalización por NormalyzerDE #####
setwd(paste(WD,"\\1. Normalyzer", sep = ""))

#Crear tablas necesarias
write.table(matrix, "Design_matrix.tsv", sep = '\t', row.names = FALSE, quote=FALSE)
write.table(MS1, "Data_matrix.tsv", sep = '\t', row.names = FALSE, quote=FALSE)

#Almacenar ruta de tablas
design <- paste0(getwd(), "\\Design_matrix.tsv")
data <- paste0(getwd(), "\\Data_matrix.tsv")

#Ejecutar normalyzer. Este paso también realiza transformación a log10
normalyzer(jobName="Normalyzer", designPath=design, dataPath=data,
outputDir=getwd(), omitLowAbundSamples=FALSE, sampleAbundThres=5.0,
  requireReplicates=FALSE,
  normalizeRetentionTime=FALSE,
  plotRows=3.0, plotCols=4.0,
  zeroToNA=FALSE,
  sampleColName="Sample",
  groupColName="Group",
  inputFormat="default",
  skipAnalysis=FALSE,
  noLogTransform=FALSE,
  rtStepSizeMinutes=1.0,
  rtWindowMinCount=100,
  rtWindowShifts=1,
  rtWindowMergeMethod="mean")

```

```

#Evaluar cuál es el mejor método de normalizar en el archivo ".\Normalyzer\Norm-report-Normalyzer"

#Leer y transponer resultado con mejor normalización. En este caso, "Quantile-normalized"
MS1_norm <- data.frame(data.table::transpose(as.data.frame(fread(paste0(getwd(),
"\Normalyzer\Quantile-normalized.txt")))))

##### Imputación by MetImp #####
setwd(paste(WD,"\\2. MetImp", sep = ""))

#Para imputación local, se requiere configurar nucleos para realizar procesamiento paralelo
no_cores <- detectCores() - 1
registerDoParallel(cores=no_cores)

#Imputación con MetImp por Random Forest. Se requiere alto procesamiento.
met.imputed <- missForest(MS1_norm, maxiter = 10, ntree = 100, parallelize = 'forests')
met_imp <- data.frame(met.imputed$ximp)

#Guardar resultado en para no repetir proceso de imputación a futuro
MS1_Imp <- write.csv(met_imp,"./MetIMP_Result.csv",row.names=FALSE)

##### MetaboAnalyst #####
setwd(paste(WD,"\\3. MetaboAnalyst", sep = ""))

#Reformatear matriz para formato de MetaboAnalyst
MS1_Imp <- data.frame(data.table::transpose(MS1_Imp))
colnames(MS1_Imp) <- matrix$Sample
MS1_Imp <- cbind(Feature, MS1_Imp[,1:(ncol(MS1_Imp)-10)]) # Remover QC

#Guardar archivo listo para todos los análisis estadísticos
write.csv(MS1_Imp,paste0(getwd(), "\\1. MS1_Norm_log_MetImp.csv"), row.names = FALSE)

```

Construcción de gráfico de pastel de clases químicas representativas

```

library(dplyr)
library(plotly)

WD <- #"Directorio de trabajo"
setwd(WD)

#Obtener biblioteca de colores de clases químicas para gráfico
Colors <- read.csv("ClassColors.csv")

#Establecer nombre, descripción de figura y nivel de filtro
name <- "FBMN_Filtered_Unique"
description <- "Únicos y filtrados por masa < 600 Da y error de masa < 10 ppm"
filter <- 6

#Leer tabla de clases químicas
Canopus <- read.csv(paste("../Classes_", name, ".csv", sep = ""))
Canopus <- data.frame(table(Canopus$Class)) %>% rename(Class = Var1)

#Separar clases filtradas
Class <- Canopus %>% filter(Freq >= filter)
Class_filtered <- Canopus %>% filter(Freq < filter) %>%
  summarise(Class = "Otros con < 6", Freq = sum(Freq)) %>% as.data.frame()

#Empatar con colores correspondientes
Class <- rbind(Class, Class_filtered) %>% merge(Colors)

#Reordenar filtrados y "Sin asignar" hacia al final de la matriz
X <- Class[Class$Class %in% c("Otros con < 6", "Sin asignar"),]
Class <- Class[Class$Class != "Sin asignar" & Class$Class != "Otros con < 6", ] %>% rbind(X)

fig_class <- plot_ly(Class, labels = ~Class, values = ~Freq, type = 'pie',
  sort = FALSE, direction = "clockwise",
  marker = list(colors= ~Color),
  textfont = list(size = 15)) %>%
  layout(font=list(size = 15),
    legend = list(title=list(text=paste('<b> Clases químicas de Canopus\\n', description)),
      x= 100, y=0.5))
fig_class

```

Cálculo de índice de diversidad de Shannon y distribución de clases significativas

```

library(dplyr)
library(vegan) # Shannon
library(plotly)
library(purrr) # map function
library(rlist) # list.filter function
library(ggpubr) # stat_compare_means function

# Establecer theme_minimal como template de gráficos
theme_set(theme_minimal(base_size = 18))
# Remover líneas mayores de cuadrícula y título de ejes
theme_update(
  panel.grid.major.x = element_blank(), panel.grid.minor = element_blank(), axis.title = element_blank())

# Establecer y crear directorios de trabajo
WD <- #"Directorio de trabajo"
setwd(WD)
dir.create("1. Shannon")
dir.create("2. RainCloud")

# Unificar librería espectral y matriz de cuantificación MS1 normalizada e imputada
Spectral_Library <- read.csv("2. Spectral Library.csv")
Class_quantitative <- read.csv("1. MS1_Norm_log_MetImp csv") %>%
  merge(Spectral_Library, by = "Feature") %>% subset(select = c(2:76,85))

#Separar cohortes, sumar abundancias y asignar clase química
Abundance_Young <- Class_quantitative[, c(1:18,20,40:56,58,59)] %>%
  mutate(Total = rowSums(.), Class = Class_quantitative$Class)

Abundance_Old <- Class_quantitative[, c(19,21:39,57,60:75)] %>%
  mutate(Total = rowSums(.), Class = Class_quantitative$Class)

#Agrupar abundancias por clase
Abundance_Young <- aggregate(Abundance_Young[,1:38], by=list(Class=Abundance_Young$Class), FUN=sum)
Abundance_Old <- aggregate(Abundance_Old[,1:37], by=list(Class=Abundance_Old$Class), FUN=sum)

#Combinar matrices y reformatear
Abundance_Sum <- full_join(Abundance_Young, Abundance_Old, by = "Class")
Abundance_Sum <- setNames(data.frame(t(Abundance_Sum)), Abundance_Sum$Class)

Abundance_Sum <- Abundance_Sum %>%
  filter(!(row.names(.) %in% "Class")) %>% mutate_all(function(x) as.numeric(x))

##### SHANNON #####
setwd(paste(WD,"\\1. Shannon", sep = ""))

#Cálculo del índice de diversidad de Shannon
Diversity <- data.frame("Shannon" = unlist( diversity(Abundance_Sum, index = "shannon")))

#Por género
Diversity$Gender <- c(rep("Male", 19), rep("Female", 19), rep("Male", 20), rep("Female", 17))

```

```
ggplot(Diversity, aes(x = Gender, y = Shannon,
  fill= Gender)) + geom_violin() + geom_point(position = position_jitter(seed = 1, width = 0.2))
```

#Por edad

```
Diversity$Age <- rep(c("Young", "Old"), each = 38) %>% head(-1)
ggplot(Diversity, aes(x = Age, y = Shannon,
  fill= Age)) + geom_violin() + geom_point(position = position_jitter(seed = 1, width = 0.2))
```

#Por cohorte. Y-M = Hombres Jóvenes; Y-F Mujeres-Jóvenes; O-M; Hombres-Mayores; O-F: Mujeres-Mayores

```
Diversity$Cohort <- c(rep("Y-M", 19),rep("Y-F", 19), rep("O-M", 20),rep("O-F", 17))
ggplot(Diversity, aes(x = Cohort, y = Shannon,
  fill= Cohort)) + geom_violin() + geom_point(position = position_jitter(seed = 1, width = 0.2))
```

#Variables para análisis estadístico

```
Male <- Diversity %>% filter(Diversity$Gender == "Male") %>% pull(Shannon)
Female <- Diversity %>% filter(Diversity$Gender == "Female") %>% pull(Shannon)
Young <- Diversity %>% filter(Diversity$Age == "Young") %>% pull(Shannon)
Old <- Diversity %>% filter(Diversity$Age == "Old") %>% pull(Shannon)
YM <- Diversity %>% filter(Diversity$Cohort == "Y-M") %>% pull(Shannon)
OM <- Diversity %>% filter(Diversity$Cohort == "O-M") %>% pull(Shannon)
YF <- Diversity %>% filter(Diversity$Cohort == "Y-F") %>% pull(Shannon)
OF <- Diversity %>% filter(Diversity$Cohort == "O-F") %>% pull(Shannon)
```

Prueba de distribución normal por prueba de Shapiro. Aceptar H0: Dist. es normal

```
shapiro.test(Hombres) #p = 0.291
shapiro.test(Mujeres) #p = 0.2624
shapiro.test(Jovenes) #p = 0.1818
shapiro.test(Mayores) #p = 0.9339
shapiro.test(YM) #p = 0.5852
shapiro.test(OM) #p = 0.8042
shapiro.test(YF) #p = 0.0757
shapiro.test(OF) #p = 0.6814
```

Prueba de varianzas homogéneas entre dos grupos para dist. normal. H0: varianzas son homogéneas

```
var.test(Hombres,Mujeres) #p = 0.03923; varianzas no homogeneas, se emplea Welch's T-test
var.test(Jovenes,Mayores) #p = 0.7112
```

Prueba de varianzas homogéneas entre más de dos grupos para dist. normal. H0: varianzas son homogéneas

```
bartlett.test(Diversity$Shannon,Diversity$Cohort) #p = 0.129
```

#Prueba estadística t-Student para dos grupos distribución normal y varianzas homogéneas

```
t.test(Hombres, Mujeres, var.equal = FALSE) # 0.4359
t.test(Jovenes, Mayores, var.equal = TRUE) # 0.5762
```

##Prueba estadística ANOVA para más de dos grupos con distribución normal y varianzas homogéneas

```
Anova <- aov(Shannon ~ Cohort, Diversity)
summary(Anova) #p = 0.81
TukeyHSD(Anova, conf.level=0.95) %>% plot(las=1 , col="brown")
```

```
##### RAINCLOUD #####
setwd(paste(WD,"\\3. RainCloud", sep = ""))

#Asignar cohortes
Cohort <- rep(c("Jovenes", "Mayores"), each = 38) %>% head(-1)
Abundance_Sum <- cbind(Cohort, Abundance_Sum)

#Crear función de prueba estadística
test.fun <- function(Abundance_Sum, col) {c1 <- combn(unique(Abundance_Sum$Cohort),2)
  sigs <- list()
  for(i in 1:ncol(c1)) {sigs[[i]] <- t.test(
    Abundance_Sum[Abundance_Sum$Cohort == c1[1,i],col],
    Abundance_Sum[Abundance_Sum$Cohort == c1[2,i],col])}
  names(sigs) <- paste(c1[1,],"vs",c1[2,])
  Tests_Cohort <- data.frame(Test=names(sigs), W=unlist(lapply(sigs,function(x) x$statistic)),
    p=unlist(lapply(sigs,function(x) x$p.value)),row.names=NULL)
  return(Tests_Cohort)}

#Realizar prueba estadística
Tests_Cohort <- lapply(colnames(Abundance_Sum)[-c(1,1)],function(x) test.fun(Abundance_Sum,x))

#Agregar "_" a nombre de columnas para facilitar lectura
names(Tests_Cohort) <- paste0((colnames(Abundance_Sum)[-c(1,1)]), "_")

#Filtrar resultados
Class_Significative <- map(Tests_Cohort, ~ filter(.x, Test == "Jovenes vs Mayores")) %>% list.filter(p < 0.05)

#Exportar resultados
write.csv(Class_Significative,"T-test.csv", row.names = FALSE)

# Revisar las clases significativas en archivo "T-test.csv". W negativo indica más significativo en mayores.
# Azaspirodecane derivatives, p = 0.00535, W = -2.88; # Azoles, p = 0.0.234, W = -2.31
# Azolidines, p = 0.0.0012, W = -3.37; # Carboximidic acids and derivatives, p = 0.031, W = 2.21
# Diazinanes, p = 0.0135, W = 2.53; # Dioxolopyrans, p = 0.0195, W = 2.39
# Keto acids and derivatives, p = 0.0488, W = -2.01 ; # Saccharolipids, p = 0.036, W = -2.14

#Creación de gráfico. Repetir por cada clase significativa.
Raincloud <- ggplot(Abundance_Sum, aes(x = Cohort, y = `Azoles`,
  fill = Cohort, colour = Cohort, "Azoles")) +
  ggdist::stat_halfeye(adjust = .5, width = .6, .width = 0, justification = -.3, point_colour = NA) +
  geom_boxplot(width = .25, outlier.shape = NA, colour = c("#e5aecd", "#8fd9c8"), alpha = 0.4) +
  scale_fill_manual(values=c("#e5aecd", "#8fd9c8")) +
  geom_point(size = 5, aes(fill=factor(Cohort)), alpha = .5, position = position_jitter(seed = 1, width = .1)) +
  scale_color_manual(values=c("#e5aecd", "#8fd9c8"))+ coord_cartesian(xlim = c(1.2, NA), clip = "off") +
  stat_compare_means(size = 8, label.x = 1.5, method = "t.test", label.y = c(10,19),
    comparisons = list("Young","Old")) + ggtitle("Azoles") +
  theme(plot.title = element_text(size = 30, hjust = 0.5, vjust = 0.5, face = "bold"))

Raincloud + xlab("Cohort") + ylab("Abundance") +
  theme(axis.text.x = element_text(hjust = 0.5, vjust = 0.5, size = rel(1))) +
  theme(axis.text.y = element_text(size = rel(2.5))) + theme(axis.title = element_text(size = 4)) +
  theme(legend.text = element_text(size = 2)) + theme(legend.title = element_text(size=2, face="bold"))
```

Cálculo de FC y gráfico de volcán

```

library(dplyr)
library(plotly)

WD <- #"Directorio de trabajo"
setwd(WD)

#Leer matriz de abundancia normalizada e imputada, y empatar con librería espectral
Features <- read.csv("2. Spectral Library.csv")
Data <- read.csv("1. MS1_Norm_log_MetImp.csv") %>%
  merge(Features, by = "Feature") %>% subset(select = c(1:76,82))
Features <- Data[,c(1,77)]
Data <- Data %>% select(c(2:19,21,41:57,59:60), c(20,22:40,58,61:76)) %>%
  mutate_all(function(x) as.numeric(as.character(x)))

#Calcular media de cohortes
Data$Young <- apply(Data, 1, function(x) mean(x[1:39]))
Data$Old <- apply(Data, 1, function(x) mean(x[40:75]))

#Función para calcular fold change (FC)
custom_FC <- function(x,y){y/x}
Data$FC <- mapply(custom_FC, Data$Young, Data$Old)

#Calcular p-value
Data$p_value <- apply(Data, 1, function(x) t.test(x[1:39], x[40:75], var.equal = T)$p.value)

#Determinar tipo de regulación, de acuerdo con filtros de p-value y FC
Data$Regulation = ifelse(Data$p_value < 0.05 & abs(log2(Data$FC)) >= 0.58496250072,
  ifelse(log2(Data$FC) >= 0.58496250072, 'Up', 'Down'), 'Stable')

#Resumen de resultados
Summary <- Data %>% dplyr::count(Regulation)

#Graficar Volcano
ggplot(data = Data, aes(x = log(FC), y = -log10(p_value), group = Regulation, colour = Regulation)) +
  geom_point(alpha = 0.5, size = 4) + scale_color_manual(values=c("blue", "grey", "red")) + xlim(c(-10, 10)) +
  labs(x="Razón de cambio (log2 FC)", y="Significancia (-log10 p-value)", title="Jóvenes vs Mayores") +
  theme_bw() + theme(panel.grid.major = element_blank(), panel.grid.minor = element_blank()) +
  theme(plot.title = element_text(size = 30, hjust = 0.5, vjust = 0.5, face = "bold")) +
  theme(axis.text.x = element_text(hjust = 1, vjust = 0.5, size = rel(1.5))) +
  theme(axis.text.y = element_text(size = rel(1.5))) +
  theme(axis.title = element_text(size = 25)) +
  theme(legend.text = element_text(size = 15)) + theme(legend.title = element_blank()) +
  annotate(geom='label', x=min(log2(Data$FC)), y=0.8*max(-log10(Data$p_value)),
    hjust=1, vjust = 1, label=paste0('n=', Summary[1,2]), size = 6) +
  annotate(geom='label', x=max(log2(Data$FC)), y=0.8*max(-log10(Data$p_value)),
    hjust=0, label=paste0('n=', Summary[3,2]), size = 6)

#Añadir Feature y nombre para guardar matriz de identificación de metabolitos significativos
Data <- cbind(Features, Data)
write.csv(Data, "Volcano.csv", row.names = FALSE)

```

Anexo C. Repositorio de Github, donde se alojan las matrices resultantes del estudio y los flujos de KNIME utilizados.

Github:

https://github.com/Jhordan-CICESE/CICESE_Skin-Aging