

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**



**Doctorado en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Estudio del metabolismo de hidrocarburos en la piel de sujetos
expuestos a derivados de petróleo**

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

Presenta:

Alan Gerardo Hernández Melgar

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Alan Gerardo Hernández Melgar

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Aldo Moreno Ulloa
Director de tesis

Dra. Carolina Álvarez Delgado

Dra. Laura Gómez Consarnau

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos

Dra. Mónica Elizabeth Tentori Espinosa



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 **Alan Gerardo Hernández Melgar** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina

Estudio del metabolismo de hidrocarburos en la piel de sujetos expuestos a derivados de petróleo

Resumen aprobado por:

Dr. Aldo Moreno Ulloa
Director de tesis

Este estudio piloto examinó los efectos de la exposición dérmica crónica a sustancias derivadas del petróleo sobre el microbioma y metaboloma de la piel. Mediante metabolómica basada en espectrometría de masas y secuenciación del gen 16S ARNr, se analizaron muestras de piel de individuos con y sin exposición ocupacional a derivados del petróleo para identificar cambios en los perfiles metabolómicos y bacterianos entre ambos grupos. Las muestras de piel se recolectaron de dos zonas anatómicas —con un hisopo de algodón— en cada sujeto; el dedo medio (una zona altamente expuesta, referida como la mano) y brazo (una zona no expuesta, utilizada como control de variabilidad intersujeto). Los resultados mostraron que las manos de los sujetos expuestos presentaron una mayor diversidad bacteriana y un enriquecimiento de bacterias con capacidad de degradar al petróleo, como *Dietzia*, *Paracoccus* y *Kocuria*. El análisis de predicción funcional bacteriana reveló un enriquecimiento en las vías metabólicas asociadas con la degradación de hidrocarburos en las manos de los sujetos expuestos, en comparación con las manos de los individuos no expuestos. No se observaron tales diferencias significativas en las comparaciones entre las muestras de los brazos (zonas sin exposición). Además, las manos de los sujetos expuestos mostraron una mayor abundancia global de metabolitos pertenecientes a clases químicas como ácidos carboxílicos, glicerofosfolípidos, compuestos organooxigenados y éteres fenólicos, entre otros compuestos. A través de análisis integrativos, se encontraron correlaciones (Spearman) positivas entre varias bacterias con capacidad de degradación del petróleo y compuestos xenobióticos, lo que sugiere una remodelación química de la piel que favorece el crecimiento de este tipo de bacterias. En conclusión, este estudio proporciona información clave sobre las alteraciones en las comunidades bacterianas y el metaboloma de la piel en sujetos con alta exposición a hidrocarburos industriales. Estos hallazgos deben ser validados en estudios con un mayor número de sujetos y en diferentes poblaciones o grupos étnicos, así como evaluar los potenciales efectos en la salud humana.

Palabras clave: piel, microbioma, metabolitos, metabarcoding, metabolómica

Abstract of the thesis presented by **Alan Gerardo Hernández Melgar** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology

Study of hydrocarbon metabolism in the skin of subjects exposed to petroleum derivatives

Abstract approved by:

Aldo Moreno Ulloa, Ph. D.
Thesis Director

This pilot study examined the effects of chronic dermal exposure to petroleum-derived substances on the skin microbiome and metabolome. Using mass spectrometry-based metabolomics and 16S rRNA gene sequencing, skin samples from individuals with and without occupational exposure to petroleum derivatives were analyzed to identify changes in the metabolomic and bacterial profiles between the two groups. Skin samples were collected from two anatomical sites in each subject using a cotton swab: the middle finger (a highly exposed area, referred to as the hand) and the arm (a non-exposed area, used as a control for inter-subject variability). The results showed that the hands of exposed subjects exhibited greater bacterial diversity and an enrichment of bacteria capable of degrading petroleum, such as *Dietzia*, *Paracoccus*, and *Kocuria*. Bacterial functional prediction analysis revealed an enrichment of metabolic pathways associated with hydrocarbon degradation in the hands of exposed subjects compared to the hands of non-exposed individuals. No such significant differences were observed in the comparisons between arm samples (non-exposed areas). Additionally, the hands of exposed subjects showed a higher overall abundance of metabolites belonging to chemical classes such as carboxylic acids, glycerophospholipids, organooxygen compounds, and phenolic ethers, among others. Through integrative analysis, positive (Spearman) correlations were found between several bacteria capable of degrading petroleum and xenobiotics, suggesting a chemical remodeling of the skin that favors the growth of these types of bacteria. In conclusion, this study provides key insights into the alterations in the bacterial communities and the skin metabolome in subjects with high exposure to industrial hydrocarbons. These findings should be validated in studies with a larger number of subjects and across different populations or ethnic groups, as well as assessing potential effects on human health.

Keywords: metabolite, skin, microbiome, metabarcoding, metabolomics

Dedicatoria

A mis padres, Mercedes Ivette Melgar Uresty y Juan Gerardo Hernández Parra. Sin su apoyo y cariño constante nada de esto hubiera sido posible. Mis éxitos también son de ustedes.

A Martha Mayela Manzano Mora, tu lucha constante me recuerda que vale la pena seguir intentando. Este esfuerzo también es tuyo.

A mis abuelas, Mercedes Uresty Daniel y María Eugenia Parra López (QEPD), ustedes me apoyaron desde muy chico. Espero estén siempre orgullosas de mí.

Agradecimientos

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 doctorado: 799364.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California y al Departamento de Innovación Biomédica por brindarme la oportunidad de pertenecer a esta magnífica institución.

Al Dr. Aldo Moreno Ulloa por darme la oportunidad de desarrollar un proyecto bajo su mentoría y en su grupo, el laboratorio MS2.

A mi comité sinodal, las Doctoras Carolina Álvarez Delgado, Laura Gómez Consarnau, Rosa María Gutiérrez Ríos y Mónica Elizabeth Tentori Espinosa, por sus críticas, comentarios y observaciones, todas fueron de mucha ayuda en la culminación de este proyecto.

A la Dra. Nadia Lizeth Caram Salas por su amistad, consejo y apoyo invaluable a lo largo de estos cuatro años.

Al personal del departamento, Adriana Mejía, Carmen Labastida y Yolanda Rivas, por siempre apoyarme y motivarme cuando la situación se tornó complicada.

Al Dr. Edgardo Sepúlveda Sánchez por escucharme y apoyarme en los momentos complicados del doctorado.

A mi prometida, Martha Mayela Manzano Mora por su amor incondicional y por motivarme a dar lo mejor de mí siempre.

A los amigos que hice durante este proceso, Joaquín López Carrillo, Paloma Almeida Luna, César Carreón Gaxiola, Angélica Hernández González, David Laín, Juan Pablo Sánchez Ovando, Melany Sánchez González, Gustavo Ramos Alcaraz y Sebastián Álvarez Costes. Su amistad la atesoro y los considero mi segunda familia.

A mis amigos que me han acompañado desde hace muchos años y pese a la distancia sé que puedo contar con ustedes, Ana Valeria Martínez Laguna, José Luis Amaro Vargas, Javier Rueda Luna, Daniel

García Beujean, Jorge Augusto Osorio Kuan, Esteban López Sampedro y David Martínez Velázquez (QEPD).

A las amigas que también fueron compañeras, que me escucharon, me brindaron soporte en momentos difíciles y creyeron en mí: Lilia Lorena Vázquez Badillo, Lisa Nataly Campos Sosa, Lorena Rodríguez Orduña y Mary Carmen Citlally Condado Huerta.

Al laboratorio MS2, en particular a Jhordan Ojeda por ser un excelente compañero.

A todos los integrantes de CICESE Running y Pound CICESE, por darme una vía para lidiar con el estrés del posgrado.

A todas las personas que me apoyaron en la rifa para poder viajar a Japón.

A mi anterior mentor, el Dr. Roberto Arreguin Espinosa de los Monteros por siempre ser una magnífica persona.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xiv
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	3
1.1.1 Anatomía de la Piel.....	3
1.1.1.1 Epidermis.....	3
1.1.1.2 Dermis	4
1.1.1.3 Hipodermis	5
1.1.2 Microorganismos que habitan la piel.....	6
1.1.3 Petróleo y sus derivados	6
1.1.3.1 Toxicidad de los derivados de petróleo	8
1.1.4 Metabolómica	9
1.1.5 Estudio de la microbiota de la piel.....	9
1.1.5.1 Gen marcador ARNr 16S.....	11
1.1.5.2 Secuenciación de siguiente generación	12
1.1.5.3 16SNGS.....	13
1.1.5.4 Análisis bioinformático 16S y asignación taxonómica	15
1.1.5.5 Inferencias del estado metabólico	16

1.1.6	Efecto de los hidrocarburos en las comunidades microbianas que habitan la piel y en el metabolismo de esta.	17
1.2	Justificación	19
1.3	Hipótesis	19
1.4	Objetivos	20
1.4.1	Objetivo general	20
1.4.2	Objetivos específicos.....	20
Capítulo 2. Metodología		21
2.1	Selección de los grupos control e impactado por la presencias de hidrocarburos	21
2.2	Pretratamiento de los hisopos	21
2.3	Recolección de la muestra	21
2.4	Análisis de amplicon ARNr 16S.....	22
2.4.1	Extracción de material genético y secuenciación	22
2.4.2	Asignación taxonómica y análisis general de la comunidad bacteriana	22
2.4.3	Análisis estadísticos en los datos de microbioma	23
2.4.4	Inferencias del estado metabólico de las comunidades bacterianas	24
2.5	Análisis metabolómicos.....	24
2.5.1	Procesamiento de muestras.....	25
2.5.2	Adquisición de datos por LC-MS/MS.....	25
2.5.3	Procesamiento quimioinformático de los datos	26
2.5.4	Análisis estadísticos en los datos de metabolómica	27
2.5.5	Anotación de metabolitos.....	28
2.6	Determinación de la interacción de los datos metabolito-bacteria.....	29
Capítulo 3. Resultados.....		31
3.1	Análisis inicial del microbioma	31

3.2	La exposición a HCs es el principal impulsor de la variación del microbioma	32
3.3	Desenmascarando el efecto de los HCs en la diversidad β	33
3.4	Composición de la comunidad bacteriana	35
3.5	Cambios en la diversidad de bacterias presentes en la piel.....	36
3.6	géneros bacterianos con diferencias significativas en su abundancia.....	37
3.7	Predicción de las funciones metabólicas con PICRUSt.....	39
3.8	Efecto de la exposición a derivados del petróleo sobre el metaboloma de la piel.....	43
3.9	Exploración el espacio químico para comprender el efecto de los hidrocarburos en la piel ..	46
3.10	Diferencias en abundancia de las clases químicas	49
3.11	Metabolitos identificados con cambios en su abundancia	51
3.12	Descripción general de las interacciones metaboloma-microbioma y los efectos de los derivados del petróleo en la superficie de la piel	51
3.13	Asociación entre la microbiota cutánea y los metabolitos	53
Capítulo 4. Discusión		58
4.1	Diversificación y enriquecimiento de las comunidades bacterianas que habitan la piel.....	58
4.2	géneros bacterianos que cambian su abundancia de manera significativa.....	59
4.3	Inferencia del estado metabólico a partir de la predicción de los genomas	64
4.4	Metaboloma de la piel	65
4.5	Diferencias en abundancia de las clases químicas	68
4.6	Correlación bacterias-metabolitos	74
Capítulo 5. Conclusiones.....		76
Capítulo 6. Perspectivas		77
Literatura citada		78
Anexos		109

Lista de figuras

Figura	Página
1. Anatomía de la piel. (Tomado y modificado de: https://www.azurlis.com/pages/skin-anatomy)	1
2. Estructuras 2D y 3D del gen ARNr 16S donde se identifican con los mismos colores, cada una de las regiones individuales. También se han coloreado algunos bloques para destacar estructuras importantes (Tomado de Yang et al., 2016) (B. Yang et al., 2016)	12
3. Flujo de trabajo de identificación bacteriana a través de 16SNGS. La extracción de ADN de las muestras se lleva a cabo en el primer paso del flujo de trabajo 16SNGS. Después de la preparación de la biblioteca, se realizará NGS de los fragmentos de ARNr 16S, seguido de un análisis bioinformático para identificar las bacterias. (Basado en lo publicado por Rizal et al., 2020 (Rizal et al., 2020)).....	14
4. Diagrama esquemático que muestra el efecto de los hidrocarburos derivados del petróleo en las células de la piel. A) Baja/Nula exposición. B) Efectos debidos a la exposición y penetración de los hidrocarburos derivados del petróleo en las células de la piel, destacan la formación de irregularidades en la superficie de la piel (arrugas), desórdenes en la pigmentación y efectos inflamatorios.	18
5. Gráfico de caja/violín de la métrica de la diversidad alfa en las muestras de piel de sujetos expuestos y no expuestos a hidrocarburos derivados del petróleo a nivel de: A) Cohorte donde: E = Expuestos y NE = No Expuestos, y B) Subcohorta donde: EA=Brazo expuesto, NEA=Brazo no expuesto, EH=Mano expuesta y NEH=Mano no expuesta. Las medianas están marcadas por las líneas horizontales dentro de los recuadros, los bigotes representan las desviaciones estándar.	32
6. Análisis de NMDS con las distancias UniFrac ponderadas (izquierda) y no ponderadas (derecha) entre las comunidades microbianas de muestras de piel de sujetos expuestos y no expuestos a hidrocarburos derivados del petróleo a nivel de cohorte. La cohorte se divide en sujetos expuestos (E) y no expuestos (NE). Cada muestra se representa mediante un círculo pequeño y el centroide, definido como la distancia media a todas las muestras para esa condición, se representa mediante un círculo de mayor tamaño.	34
7. Análisis de NMDS con las distancias UniFrac ponderadas (izquierda) y no ponderadas (derecha) entre las comunidades microbianas de muestras de piel de sujetos expuestos y no expuestos a hidrocarburos derivados del petróleo a nivel de subcohorta. La subcohorta se divide en brazo expuesto (EA), brazo no expuesto (NEA), mano expuesta (EH) y mano no expuesta (NEH). Cada muestra se representa mediante un círculo pequeño y el centroide, definido como la distancia media a todas las muestras para esa condición, se representa mediante un círculo de mayor tamaño.....	34
8. Gráfico de barras de los 15 géneros bacterianos más abundantes a nivel de cohorte (A) y subcohorta (B).	35

9. Upset que muestra la presencia de los géneros bacterianos únicos y compartidos por cada grupo. Se removieron los géneros que se compartían entre todos los grupos. 36
10. Bacterias con abundancias diferenciales (log₁₀ CPMS) entre grupos ($p < 0,05$, prueba de Mann–Whitney). Abreviaturas: EA; brazo expuesto, NEA; brazo no expuesto, EH; mano expuesta y NEH; mano no expuesta..... 38
11. Gráfico de PCA obtenido del análisis con STAMP de perfiles funcionales proyectados por PICRUSt (nivel 2, ortología KEGG) a niveles de cohorte (A) y subcohorte (B). La cohorte se divide en sujetos expuestos (E) y no expuestos (NE), mientras que la subcohorte se divide en brazo expuesto (EA), brazo no expuesto (NEA), mano expuesta (EH) y mano no expuesta (NEH). .. 39
12. Mapa de calor de las predicciones según la abundancia relativa de KO anotada en el nivel 3 de KEGG a nivel de cohorte. Donde, E = Sujetos expuestos, NE = Sujetos no expuestos. Las vías metabólicas mostradas son las que tienen un cambio en su expresión estadísticamente significativo ($p < 0.05$), entre las muestras mediante una prueba t. 40
13. Mapa de calor de las predicciones según la abundancia relativa de KO anotada en el nivel 3 de KEGG a nivel de subcohorte. Donde, EA = Brazo expuesto, NEA = Brazo no expuesto, EH = Mano expuesta y NEH = Mano no expuesta. Las vías metabólicas mostradas son las que tienen un cambio en su expresión estadísticamente significativo ($p < 0.05$), entre las muestras mediante un ANOVA..... 41
14. Gráfico de barras de error extendido que muestra los KO con cambios significativos a nivel global (nivel KEGG 3) entre las subcohortes EH y NEH. EH = Mano expuesta y NEH = Mano no expuesta. 42
15. KO significativamente desregulados (nivel KEGG 3) asociados con el metabolismo de hidrocarburos entre las subcohortes EH y NEH (A) y EA y NEA (B)..... 43
16. Análisis de componentes principales generado con MetaboAnalyst 4.0 de 804 atributos a nivel de cohorte (A) y subcohorte (B). Donde, E = Sujetos expuestos, NE = Sujetos no expuestos, EA = Brazo expuesto, NEA = Brazo no expuesto, EH = Mano expuesta y NEH = Mano no expuesta. 44
17. Mapa de calor de las 50 señales principales clasificadas por una prueba t que muestra su abundancia relativa escalada (z-score) a nivel de cohorte. Esta visualización permite distinguir los cambios en abundancia para cualquier molécula (filas) por muestra de cada sujeto (columnas). El número en la parte inferior del mapa de calor es el número de identificación de cada muestra. El color varía desde el rojo intenso (abundancia o nivel alto) hasta el azul profundo (abundancia o nivel bajo); el color blanco representa que no hubo cambio. Donde, E = Sujetos expuestos, NE = Sujetos no expuestos. 45
18. Mapa de calor de las 50 señales principales clasificadas por una ANOVA que muestra su abundancia relativa escalada (z-score) a nivel de cohorte. Esta visualización permite distinguir los cambios en abundancia para cualquier molécula (filas) por muestra de cada sujeto (columnas). El número en la parte inferior del mapa de calor es el número de identificación de cada muestra. El color varía desde el rojo intenso (abundancia o nivel alto) hasta el azul profundo (abundancia o nivel bajo); el color blanco representa que no hubo cambio. Donde,

- EA = Brazo expuesto, NEA = Brazo no expuesto, EH = Mano expuesta y NEH = Mano no expuesta
 45
19. Gráfico de volcán generado partir de las diferencias en abundancia de las moléculas con un umbral de cambio de 2 (eje x) y un umbral de prueba t (eje y) de 0.05 analizados con varianzas desiguales entre las muestras de manos (A) y brazos (B) de sujetos expuestos y no expuestos a hidrocarburos. Los círculos rojos representan abundancias mayores, mientras que los azules, abundancias menores al umbral. Cuanto más lejos estén del cero más significativa es la diferencia..... 46
 20. Red molecular de metabolitos detectados en todas las muestras que muestra la diversidad química. Cada nodo representa un ion precursor (MS1) y el grosor de los bordes entre los nodos indica similitud en los patrones de fragmentación de MS2. El tamaño del nodo indica el valor m/z. Se organizaron un total de 403 nodos espectrales de masas (en un rango de masas de 143,1063 a 1310,9960 m/z). El color del nodo denota la anotación estructural de la red molecular global a nivel de superclase utilizando NAP (clasificación ClassyFire). Para cada red con ≥ 2 nodos, NAP asignó una estructura candidata de consenso por nodo y, posteriormente, cada estructura se clasificó utilizando ClassyFire, donde se recuperaron las clasificaciones de consenso más frecuentes por red o clúster para asignar una anotación de superclase putativa a cada red o clúster. Los clústeres con nodos grises indican una superclase sin asignar. 47
 21. Diversidad química global identificada por grupo. Las clases químicas (baso en Classyfire) fueron identificadas y asignadas a los atributos detectadas que poseen un MS2 en todos los grupos..... 48
 22. Clases químicas afectadas significativamente (valor $p < 0.05$, prueba t) a nivel de cohorte. Se graficó la abundancia sumada (Log2) de todos los metabolitos asignados a cada clase química. Donde, E = Sujetos expuestos y NE = Sujetos no expuestos. 49
 23. Las clases químicas desregulan significativamente (valor $p < 0.05$, prueba t) a nivel de subcohorte. Se graficó la abundancia sumada (Log2) de todos los metabolitos asignados a cada clase química. Donde, EA = Brazo expuesto, NEA = Brazo no expuesto, EH = Mano expuesta y NEH = Mano no expuesta. 50
 24. Análisis interómico de Procrustes (A) y coinercia (B) a nivel de cohorte Cada punto de datos representa una muestra individual y tiene diferentes formas (metaboloma, punto; microbioma, cuadrado). Las líneas representan la distancia o la similitud entre el microbioma y el metaboloma. Las líneas más largas indican más disimilitud. Los valores del coeficiente R y P se calcularon utilizando el análisis de correlación de Spearman. En Procrustes, el coeficiente de correlación R es entre 0 y 1, y cuanto más cerca está 1 indica la mayor similitud entre dos conjuntos de datos. El valor de $P < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. Para la coinercia, el coeficiente de RV es el coeficiente de correlación entre los dos conjuntos de datos y varía entre 0 y 1. Cuanto más cerca esté 1 indica la mayor similitud entre dos conjuntos de datos. Donde, E = Sujetos expuestos y NE = Sujetos no expuestos. 52
 25. Análisis interómico de Procrustes (A) y coinercia (B) a nivel de subcohorte. Cada punto de datos representa una muestra individual y tiene diferentes formas (metaboloma, punto; microbioma, cuadrado). Las líneas representan la distancia o la similitud entre el microbioma y el metaboloma. Las líneas más largas indican más disimilitud. Los valores del coeficiente R y P se calcularon utilizando el análisis de correlación de Spearman. En Procrustes, el coeficiente

- de correlación R es entre 0 y 1, y cuanto más cerca está 1 indica la mayor similitud entre dos conjuntos de datos. El valor de $P < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. Para la coineria, el coeficiente de RV es el coeficiente de correlación entre los dos conjuntos de datos y varía entre 0 y 1. Cuanto más cerca esté 1 indica la mayor similitud entre dos conjuntos de datos. Donde, EA = Brazo expuesto, NEA = Brazo no expuesto, EH = Mano expuesta y NEH = Mano no expuesta..... 52
26. Diagrama de cuerdas que muestra el análisis de asociación a nivel de cohorte basado en el análisis de correlación de Spearman. Las líneas rojas y azules especifican correlaciones positivas y negativas, respectivamente..... 53
27. Diagrama de cuerdas de la comparación entre manos que muestra la asociación basada en el análisis de correlación de Spearman. En el diagrama de cuerdas, las líneas rojas y azules especifican correlaciones positivas y negativas, respectivamente. 54
28. Mapa de calor que muestra el análisis de asociación a nivel de cohorte basado en el análisis de correlación de Spearman. Los mapas de calor expanden los resultados que se muestran en los diagramas de cuerdas. La correlación de Spearman, R, varía entre - 1 a 1. $p < 0.05$ indica una correlación estadísticamente significativa. El color rojo y el color azul indican correlaciones positivas y negativas respectivamente. El símbolo * y ** indican el valor de P para los coeficientes de correlación menores que 0.05 o 0.01, respectivamente. 55
29. Mapa de calor para comparación entre manos que muestra la asociación basada en el análisis de correlación de Spearman. Los mapas de calor expanden los resultados que se muestran en los diagramas de cuerdas. La correlación de Spearman, R, varía entre - 1 a 1. $p < 0.05$ indica una correlación estadísticamente significativa. El color rojo y el color azul indican correlaciones positivas y negativas respectivamente. El símbolo * y ** indican el valor de P para los coeficientes de correlación menores que 0.05 o 0.01, respectivamente. 56

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Fracciones de la destilación del petróleo con su punto de ebullición y aplicaciones generales [Tomado y modificado de Eneh y colaboradores (Eneh, 2011)].	8
2. Parámetros antropométricos y de exposición a HCs de los sujetos de estudio	31
3. Comparación de dos grupos del índice de diversidad de Shannon a nivel de subcohorte.	33
4. Resultados de la prueba de U de Mann-Whitney sobre la abundancia de géneros a nivel de cohorte.	37
5. Datos de abundancia bacteriana utilizados para análisis estadísticos y comparaciones entre grupos (transformados en log10) (Disponible como archivo CSV)	109
6. Resultados de la prueba de Adonis para todos los grupos	109
7. Clasificación taxonómica de los identificadores ASV (Disponible como archivo CSV)	109
8. Tabla de cuantificación de abundancia de géneros normalizada e imputada para todas las muestras (transformada en log10) (Disponible como archivo CSV)	109
9. Tabla de cuantificación de atributos de datos metabolómicos (transformados en log2) (Disponible como archivo CSV)	109
10. Lista de metabolitos anotados por GNPS mediante herramientas de correspondencia espectral y anotación de estructura <i>in silico</i> (Disponible como archivo CSV)	109
11. Lista de metabolitos supuestamente anotados con abundancia diferencial entre los grupos EH y NEH (Disponible como archivo XLSX)	109
12. Lista de metabolitos anotados con abundancia diferencial entre los grupos EA y NEA (Disponible como archivo XLSX)	109

Capítulo 1. Introducción

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y actúa como una capa aislante entre los órganos internos y el ambiente. Está compuesta por tres niveles principales: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Agarwal & Krishnamurthy, 2024), cuyo grosor, composición y especialización varían según la ubicación en el cuerpo (R. Wong et al., 2016) (Figura 1).

La epidermis es la capa superior y más activa del cuerpo, ya que funciona como una barrera física, bioquímica e inmunológica (Proksch et al., 2008). Está compuesta principalmente por queratinocitos, que representan entre el 90% y 95% de su composición (Cashman & Sloan, 2010).

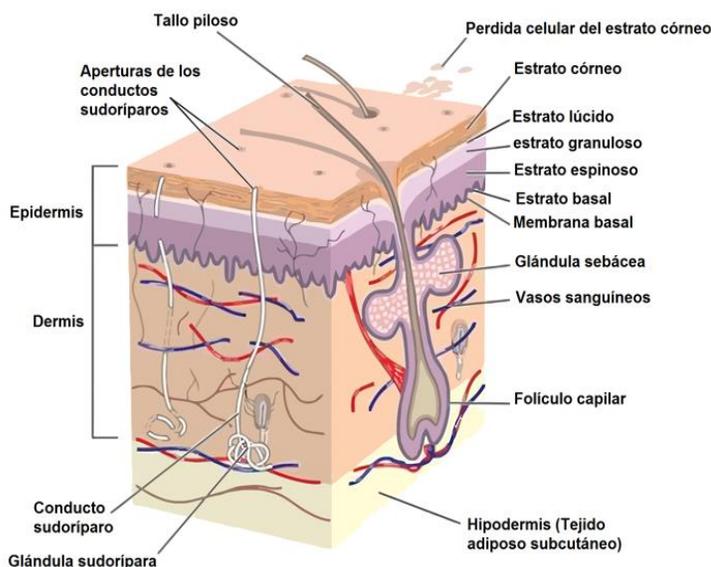


Figura 1. Anatomía de la piel. (Tomado y modificado de: <https://www.azurlis.com/pages/skin-anatomy>)

La capa más superficial de la piel está expuesta constantemente a peligros del medio, como agentes patógenos, riesgos físicos y químicos, y pérdida descontrolada de agua y solutos (Gallo, 2017). Los factores dañinos incluyen variaciones en pH, temperatura, radiación UV y contacto con agentes nocivos (como metales pesados y moléculas tóxicas) (Fore, 2006; Gallo, 2017; Lai et al., 2009; Plewig et al., 2019; Proksch et al., 2008). Entre las muchas moléculas tóxicas a las que la piel se expone constantemente, resaltan los hidrocarburos (HCs) derivados del petróleo. Estos se encuentran en cosméticos, plásticos, ropa, pinturas, fármacos, gasolina, lubricantes y aceites (Eneh, 2011; Flament et al., 2018; Kežić et al., 2010; «Petroleum Derivatives: Synthesis and Application», 2017).

Los HCs abarcan una amplia variedad de estructuras y propiedades fisicoquímicas, desde cadenas lineales simples hasta complejos heterociclos. La exposición a estos compuestos puede tener un impacto negativo en la salud humana, especialmente debido a su alta reactividad y lipoficidad, que les permite atravesar las células y alterar su estructura (Du et al., 2012; Harwood et al., 2013; Luo et al., 2014; Montagnoli et al., 2015), así como penetrar en los tejidos y acumularse en ellos (K. W. Brown & Armstrong, 2021; Kežić et al., 2010; Mckee & Plutnick, 1989; Ragusa et al., 2021).

Recientes estudios han identificado diversos derivados de petróleo, como el polipropileno, en la placenta humana mediante espectroscopia de Raman (Ragusa et al., 2021). Además, se ha demostrado que los hidrocarburos pueden tener efectos carcinogénicos (Mckee & Plutnick, 1989), inflamatorios (Tauchi et al., 2005) y pueden afectar la capacidad cognitiva (Berr et al., 2010; Meyer-Baron et al., 2008; Sabbath et al., 2012), así como producir aductos de ADN en los pulmones (Boström et al., 2002) y, en mayor medida, en la piel (J. H. Lee & Talaska, 1999).

La exposición a HCs puede causar daños graves en la piel, desde envejecimiento prematuro (Flament et al., 2018; Kežić et al., 2010) y desórdenes en la pigmentación (aparición de manchas en la piel) (Kežić et al., 2010; Puri et al., 2017), hasta cambios morfológicos como arrugas (Eshak, 2012; Kežić et al., 2010; Puri et al., 2017), acné (Kežić et al., 2010; Puri et al., 2017) y cáncer (P. Gao et al., 2018; Kežić et al., 2010; Mckee & Plutnick, 1989; Puri et al., 2017) (Figura 2). En particular, la interacción del metabolismo celular con algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) puede conducir a la formación de productos (metabolitos) potencialmente carcinógenos (P. Gao et al., 2018), lo que hace que el cáncer sea una patología importante asociada a esta exposición.

Los HCs también inciden en la microbiota que habita en la piel al alterar la estructura de la comunidad. La piel es el hogar de diversos microorganismos, como bacterias, virus eucarióticos, arqueas, bacteriófagos y microbios eucarióticos (Byrd et al., 2018), que interactúan de manera constante con su hospedero a través de genes y productos genéticos (Proctor, 2011). Esta interacción tiene un efecto generalmente beneficioso para el hospedero (Cogen et al., 2008), ya que previene la colonización por patógenos, modula la respuesta inflamatoria y “educa” al sistema inmune (Byrd et al., 2018; Cogen et al., 2008; Gallo, 2017).

Algunos informes recientes indican que, ciertas comunidades microbianas tienen la capacidad de degradar HCs y otros compuestos químicos extraños (Sowada et al., 2014, 2017). Además, los HCs pueden influir en la diversidad taxonómica de los microorganismos presentes en la piel, favoreciendo a aquellos capaces de degradar estas sustancias (Leung et al., 2020).

Dado el papel crucial de los microorganismos en la salud humana, es fundamental evaluar cómo la exposición a los HCs afecta a las comunidades microbianas que habitan en la piel y su posible impacto negativo en el huésped.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Anatomía de la Piel

La piel actúa como una barrera que protege al cuerpo del medio ambiente externo, y logra esta función gracias a su compleja estructura que incluye ligamentos reticulares, nervios, vasos sanguíneos y linfáticos, y su conexión con el endoesqueleto (Arda et al., 2014; R. Wong et al., 2016) y la estructura corporal. La forma de la piel puede variar en función de factores como la ubicación del cuerpo, la edad, el género y la presencia de enfermedades como la obesidad (R. Wong et al., 2016).

La piel se compone de tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis, cada una con funciones específicas y una composición única (Mikesh et al., 2013; R. Wong et al., 2016). Análisis de micro disecciones de la piel utilizando proteómica de tipo "Bottom up" identificaron entre 155 y 174 proteínas, incluyendo colágenos constitutivos (I, II, III, VI, XII y XIV), elastina, lumicano, prolargina, decorina, mimecano, periostina, queratinas citoesqueléticas (9, 10, 13, 14, 15 y 16 del tipo I) y (1, 2, 5 y 75 del tipo II), así como actina, miosina, tubulina, laminina y otras proteínas intracelulares (Maceo, 2017; R. Wong et al., 2016).

1.1.1.1 Epidermis

La epidermis es la capa externa que previene la evaporación del agua, protege los tejidos y actúa como un órgano receptor (Mikesh et al., 2013). Su grosor varía de 75 a 150 μm , llegando a más de 500 μm en las palmas de las manos y plantas de los pies (R. Wong et al., 2016) y se define como: un "epitelio estratificado con una renovación constante y una diferenciación progresiva (queratinización, conificación) desde la dirección basal hacia la superficial" (Freinkel & Woodley, 2001). En otras palabras, es una capa de células que se renueva continuamente a medida que se generan nuevas células en la capa basal y se desplazan hacia la superficie para reemplazar a las células que se desprenden de la misma. Durante este proceso, las

células sufren modificaciones secuenciales en su constitución química (Mikesh et al., 2013). Los procesos que influyen en la estructura y función de la epidermis se suceden durante toda la vida (Freinkel & Woodley, 2001; Mikesh et al., 2013). Para mantener un equilibrio adecuado entre la proliferación y la diferenciación/apoptosis de las células (queratinocitos principalmente) (Freinkel & Woodley, 2001; R. Wong et al., 2016), se necesita un control preciso debido a la renovación celular constante de esta capa. Este equilibrio es esencial para mantener la integridad de la epidermis como tejido.

Los queratinocitos son las células más abundantes en la epidermis y se generan a partir del ectodermo durante las primeras semanas del desarrollo embrionario (Freinkel & Woodley, 2001; R. Wong et al., 2016). Su estructura está relacionada con su posición y nivel de diferenciación en la epidermis y se caracterizan por tener filamentos intermedios de queratina con una longitud de 8 a 10 nm (Freinkel & Woodley, 2001; Mikesh et al., 2013). Estos filamentos se ubican debajo de los microtúbulos (23 nm) y encima de los microfilamentos (6 nm) (Freinkel & Woodley, 2001).

Los queratinocitos de la epidermis se subdividen en cinco capas principales: estrato basal, espinoso, granuloso y córneo. Estas capas se nombran según la apariencia de los queratinocitos observados bajo el microscopio. A medida que los queratinocitos son empujados hacia la superficie, cambian su apariencia, composición y se diferencian a través de la queratinización o cornificación, que está genéticamente programada y se regula mediante procesos morfológicos y metabólicos (Freinkel & Woodley, 2001; Mikesh et al., 2013).

La epidermis contiene también melanocitos, células que producen melanina, el pigmento responsable de la pigmentación de la piel y que actúa como protector del ADN de los queratinocitos contra la radiación solar (Mikesh et al., 2013).

1.1.1.2 Dermis

La dermis, con un grosor de dos a cuatro milímetros, es el tejido que sostiene y conecta la epidermis con la hipodermis. Proporciona soporte estructural y nutrición a la epidermis, protección contra lesiones mecánicas, retiene agua, ayuda a regular la temperatura corporal y además, contiene receptores sensoriales (Freinkel & Woodley, 2001; R. Wong et al., 2016).

Está compuesta principalmente por elementos fibrosos que envuelven a los apéndices de la epidermis, como los receptores sensoriales, redes neurovasculares y células, con una menor proporción en comparación con la epidermis. Los fibroblastos son responsables de la síntesis y degradación de los elementos fibrosos y no fibrosos de la matriz extracelular. Contiene elementos fibrosos como el tejido elástico conectivo y el colágeno, que proporciona elasticidad y resistencia mecánica a la dermis. Además, se encuentran glicoproteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos en esta capa (Freinkel & Woodley, 2001; Saulis et al., 2002; R. Wong et al., 2016).

La dermis también se constituye por dos subcapas: la papilar y la reticular. La subcapa papilar forma las papilas dérmicas, pequeñas estructuras con forma de crestas que interactúan con los folículos pilosos circundantes. La subcapa reticular es el tejido conectivo que contiene la mayor cantidad de fibras elásticas de colágeno, las cuales se conectan con la hipodermis (Freinkel & Woodley, 2001; Mikesch et al., 2013; R. Wong et al., 2016). Finalmente, es importante destacar que el colágeno es responsable de hasta el 75% del peso seco de la piel (Solano, 2020).

1.1.1.3 Hipodermis

La hipodermis es una capa de tejido conectivo que se encuentra debajo de la dermis reticular y es responsable de proporcionar amortiguación, dar forma a los contornos del cuerpo y permitir que la piel se mueva sobre las estructuras subyacentes. Además, la hipodermis actúa como reserva de energía en forma de tejido adiposo (Freinkel & Woodley, 2001; Mikesch et al., 2013).

Esta capa de la piel también contiene proteoglicanos y glicosaminoglicanos, los cuales promueven la irrigación sanguínea y linfática y contribuyen a las propiedades mencionadas anteriormente (Guimberteau et al., 2010; R. Wong et al., 2016). La presencia de diferentes tipos celulares como fibroblastos, macrófagos y adipocitos también es notable en la hipodermis. Además, también cuenta con una abundante irrigación sanguínea y linfática (Mikesch et al., 2013; R. Wong et al., 2016).

En particular, los adipocitos son células especializadas que almacenan grasa subcutánea y se organizan en lóbulos mediante tejido conectivo fibroso. Además de proporcionar un efecto de amortiguación, la grasa subcutánea también ayuda a regular la temperatura corporal y proporciona aislamiento térmico al cuerpo.

1.1.2 Microorganismos que habitan la piel

Al ser el órgano más grande del cuerpo humano, la piel es el hogar de muchos microorganismos que forman parte de la microbiota cutánea (Byrd et al., 2018; Eisenstein, 2020; Kong & Segre, 2012; Ross et al., 2018). Estos microorganismos incluyen bacterias, hongos y virus que habitan la superficie de la piel y los folículos pilosos (Baron et al., 2005; Roth & James, 1988). La mayoría de estos microorganismos no son patógenos y, de hecho, algunos de ellos son beneficiosos para la salud de la piel (Almoughrabie et al., 2023; Christensen & Brüggemann, 2014; Lai et al., 2009).

Entre las bacterias que habitan en la piel, se encuentran los estafilococos y los estreptococos. Aunque estos microorganismos pueden ser patógenos, las características anatómicas, físicas y químicas de la piel generalmente la protegen, haciendo que no sea susceptible a infecciones por estos microorganismos (Christensen & Brüggemann, 2014; Cogen et al., 2008; Murphy & Frick, 2013). También se encuentran bacterias como *Propionibacterium acnes*, que están implicadas en el desarrollo del acné (Almoughrabie et al., 2023; Marples et al., 1971; Toyoda & Morohashi, 2001). Algunas bacterias producen ácidos que ayudan a mantener la piel ligeramente ácida, lo que es importante para prevenir el crecimiento excesivo de otros microorganismos (Marples et al., 1971; M. Yang et al., 2020). Los hongos también son comunes en la piel, especialmente en las áreas húmedas y cálidas como los pliegues cutáneos y los pies. El hongo *Candida albicans* es común en la piel y puede causar infecciones en ciertas circunstancias (Gallo, 2017; Shahabudin et al., 2024). Sin embargo, en general, los hongos en la piel no causan problemas. Igualmente los virus habitan la piel, especialmente el virus del papiloma humano (VPH) y el virus del herpes simple (VHS) (Byrd et al., 2018; Y. E. Chen et al., 2018). Aunque estos virus pueden causar infecciones, la mayoría de las veces permanecen latentes en la piel sin causar síntomas.

1.1.3 Petróleo y sus derivados

La palabra petróleo proviene del latín "*petroleum*" que significa "aceite de piedra" (Eneh, 2011). Se trata de un material natural presente en la Tierra compuesto predominantemente por carbono e hidrógeno (hidrocarburos), aunque también puede contener elementos no metálicos como sulfuro, nitrógeno y oxígeno (Dembicki, Jr., 2017). El petróleo generalmente se presenta en estado líquido, con una coloración que va desde el amarillo hasta el negro (Eneh, 2011), pero puede existir en otros estados de la materia, como gas o sólido, dependiendo de su naturaleza química y de las condiciones de presión y temperatura (Dembicki, Jr., 2017; Eneh, 2011).

El petróleo tiene dos principales aplicaciones: como fuente de energía para calefacción, iluminación y locomoción a través de la combustión, y como materia prima para la síntesis de muchas sustancias (Eneh, 2011), destacando las siguientes:

- Combustibles: gasolina, diésel, queroseno, combustóleo, gas natural, gas licuado del petróleo (GLP) y aceite combustible, entre otros.
- Lubricantes: aceites y grasas lubricantes para motores, maquinarias y equipos.
- Plásticos: polietileno, polipropileno, PVC, poliestireno, entre otros polímeros sintéticos.
- Productos químicos: como el benceno, tolueno, xileno, fenol, metanol, etileno, propileno, butadieno, entre muchos otros, que se utilizan para producir otros productos químicos como resinas, pinturas, fibras textiles, detergentes, cosméticos, medicamentos, entre otros.
- Asfalto: utilizado para la construcción de carreteras, techos y otros constituyentes.
- Otros productos: como la parafina, cera, nafta, aceites aromáticos, betún, entre otros.

Entre los hidrocarburos que constituyen el petróleo, se incluyen los alcanos que componen cerca del 90% del petróleo crudo, las parafinas (ramificadas y no ramificadas), naftenos o cicloparafinas, olefinas, y muchos otros compuestos aromáticos (Eneh, 2011; McKee & White, 2014). El proceso mediante el cual se obtienen productos útiles a partir del petróleo se conoce como refinamiento e incluye procesos como destilación y filtración (Eneh, 2011).

El punto de ebullición de los compuestos derivados del petróleo está relacionado con el número de carbonos que conforman la molécula. Por lo general, mientras más complejos son los compuestos, más elevado es el punto de ebullición y, consecuentemente, su masa molecular aumenta (McKee & White, 2014). El punto de ebullición puede variar entre los 20 y los 400 °C, dependiendo del estado en que se encuentran los productos. Por ejemplo, la mayoría de los productos líquidos del petróleo están compuestos por entre cinco y diez átomos de carbono (Eneh, 2011). La Tabla 1 muestra el rango de ebullición y número de carbonos que componen las sustancias derivadas del petróleo, así como algunas de sus aplicaciones.

Tabla 1. Fracciones de la destilación del petróleo con su punto de ebullición y aplicaciones generales [Tomado y modificado de Eneh y colaboradores (Eneh, 2011)].

Rango de ebullición (°C)	Número de átomos de carbono que componen la molécula (C _x)	Nombre común	Usos generales
<20	1 a 4	Gas natural (compuestos gaseosos)	Combustible. Materias primas para la síntesis química
0 – 30	-	Gas natural (rigoleno y cymogeno)	El rigoleno es un producto intermediario entre el cymogeno y la gasolina, contiene principalmente pentanos y anteriormente se utilizaba como anestésico tópico. El cymogeno está compuesto mayoritariamente por butano y se utiliza para generar bajas temperaturas
20 – 90	5 a 7	Petróleo ligero (éter de petróleo)	Solvente
30 – 150	5 a 14	Nafta cruda	Solvente
70 – 200	6 a 18	Gasolina	Combustible, solvente
120 – 160	5 a 10	Benceno	Solvente para las industrias del aceite y la pintura
150 – 300	10 a 38	Queroseno (parafina)	Combustible para calefacción y de motores de reacción, fabricación de insecticidas, disolvente, agente dieléctrico
>275	12 a 20	Diésel (gasóleo)	Combustible
300 – 400	20 a 24	Aceite lubricante	Lubricantes para motores de combustión internas, fabricación de velas, pulidor de zapatos, etc.
>400	21 a 30	Cera de parafina	Fabricación de velas, papel encerado, pulidor, base de cosméticos y aislante eléctrico
Residuos sólidos	>40	Asfalto, betún o chapopote Vaselina Coque de petróleo	Pavimentar Lubricante y base cosmética Fabricar ánodos en la industria de la fundición

1.1.3.1 Toxicidad de los derivados de petróleo

Debido a la diversidad y complejidad de las estructuras de los hidrocarburos derivados del petróleo, determinar su toxicidad puede ser una tarea difícil. En general, aunque hay excepciones, estas moléculas tienden a compartir características toxicológicas y son pocas las que poseen una toxicidad inherente a sus propiedades físico-químicas particulares (McKee & White, 2014). Sin embargo, se ha observado que, en general, entre más larga sea la cadena de carbonos y entre más anillos de benceno contenga, mayor será su toxicidad.

Con base en su grado de toxicidad, estos hidrocarburos pueden agruparse de la siguiente manera: xilenos > tolueno > pireno > antraceno y fenantreno > naftaleno > benceno > crudo pesado > crudo ligero > otros hidrocarburos aromáticos > alcanos (Bopp & Lettieri, 2007; Montagnolli et al., 2015; Paixão et al., 2007; L. Wang et al., 2008).

Es importante destacar que muchos de los productos generados a partir de la combustión o refinación de estos derivados del petróleo también representan un elevado riesgo para la salud, ya que contienen HAPs, HAPs alquilados, alcanos (ramificados o no), cicloalcanos, alquilbencenos, ácidos carboxílicos, butadieno, metil terbutil-éter y xileno. Estos compuestos están relacionados con la aparición y desarrollo de diversos trastornos, principalmente cáncer en diferentes órganos como el riñón, cerebro, páncreas, hígado, próstata, piel, tractos aéreos y digestivo, así como en las células del sistema sanguíneo (leucemia), entre otros (Khanna & Gharpure, 2017; Liang et al., 2005; Mckee & Plutnick, 1989; Mehlman, 1991).

1.1.4 Metabolómica

En el metabolismo celular, tanto en nuestras células como en los microorganismos que nos colonizan, ocurren diversas reacciones químicas que producen una gran cantidad de moléculas, ya sean intermediarias o productos finales, conocidas como metabolitos.

El estudio sistemático de los metabolitos en un organismo, célula o tejido es conocido como metabolómica (Rivera & Garrido, 2018). Esta ciencia refleja la fisiología celular, ya que es la expresión final de los procesos bioquímicos que comienzan con la expresión de los genes. Además, estudia los resultados finales de las interacciones organismo-medio ambiente, lo que permite evaluar las funciones y la salud del organismo a nivel molecular (Bauermeister et al., 2022; Jarmusch et al., 2019; Rivera & Garrido, 2018).

En años recientes, la metabolómica ha recibido un gran impulso gracias a las mejoras en la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y la quimiinformática. Estas herramientas permiten detectar e identificar cientos-miles de metabolitos en poco tiempo (Sawada & Yokota Hirai, 2013), lo que facilita la comprensión de la dinámica de los metabolitos, al medir cambios en su abundancia como respuesta a estímulos ambientales o alteraciones en el entorno.

1.1.5 Estudio de la microbiota de la piel

El ser humano es un reservorio de microorganismos que forman complejos ecosistemas debido a su interacción con su hospedero (Tang et al., 2019). El estudio de la microbiota es un área en constante evolución debido al interés en comprender las comunidades microbianas que habitan en diferentes entornos, incluyendo el cuerpo humano. Como ya se hizo mención, la microbiota puede influir en la salud

y el bienestar de su hospedero, y los cambios en su composición, se han relacionado con diversas patologías.

Antiguamente, el análisis de las comunidades microbianas en la piel se basaba en el cultivo de los microorganismos obtenidos de una muestra y estaba limitado a la capacidad de proporcionar las condiciones idóneas para el cultivo y aislamiento microbiano. No obstante, los estudios pioneros lograron reportar la presencia de diversos estafilococos, como *S. epidermidis*, y otros colonizadores comunes de la piel que pertenecen a los géneros *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Brevibacterium* y *Micrococcus* (Fredricks, 2001; Kong & Segre, 2012; Leydcn et al., 1987; Roth & James, 1988). Asimismo, se logró el aislamiento y cultivo del género *Malassezia*, una especie fúngica comúnmente presente en áreas sebáceas de la piel (Fredricks, 2001; Kong & Segre, 2012).

Sin embargo, este enfoque tiene la limitación de subestimar la diversidad total de la comunidad al seleccionar solo aquellos organismos que pueden crecer en condiciones artificiales (Byrd et al., 2018). Por ejemplo, el género *Staphylococcus* tiende a tener mejores tasas de crecimiento en cultivo en comparación con los géneros *Propionibacterium* o *Corynebacterium* (Byrd et al., 2018). Además, algunos géneros requieren condiciones particulares que los hacen difíciles de aislar en cultivo, como es el caso de *Treponema pallidum* (Kong & Segre, 2012). En conclusión, el porcentaje de microorganismos que pueden ser cultivado es realmente bajo, algunos autores sugieren que para muestras de agua de mar, agua o sedimentos, menos del 1% de las bacterias pueden ser cultivadas (Amann et al., 1995) y para el caso de heces humanas, del 60 al 80% de las bacterias observables, no pueden ser cultivadas (Suau et al., 1999).

Con el desarrollo de las técnicas de biología molecular, se ha mejorado la identificación y cuantificación de los microorganismos que habitan en la piel, lo que ha permitido un mejor entendimiento de este mundo microbiano (Kong & Segre, 2012).

En contraposición al cultivo, la extracción y caracterización del ADN de comunidades microbianas se ha vuelto la técnica más utilizada para la identificación de microorganismos (Amann et al., 1995; Fredricks, 2001). En bacterias, el gen más comúnmente utilizado como marcador es el que codifica para la subunidad menor del ARN ribosomal (ARNr 16S), que se encuentra presente en todas las bacterias y arqueas conocidas y posee regiones conservadas para la unión de los cebadores de PCR, así como regiones variables que permiten la identificación y diferenciación de bacterias o la inferencia de relaciones filogenéticas (Byrd et al., 2018; Fredricks, 2001; Kong & Segre, 2012).

Por su parte, el gen ITS1 es el más utilizado para la identificación de hongos, ya que codifica para la región del ARNr llamada espaciador interno transcrito 1 (ITS1, por sus siglas en inglés) (Ávila-Rodríguez et al., 2018; Byrd et al., 2018). Esta región es ampliamente conservada en los hongos, lo que la hace ideal para la detección de diferentes especies (Nilsson et al., 2008).

Además, la secuenciación del ITS1, permite la identificación de aquellas especies que no pueden ser identificadas por medio de métodos tradicionales, basados en características morfológicas (Nilsson et al., 2008). Conduciendo también a la caracterización de nuevas especies de hongos (Arifin et al., 2022; Sugawara et al., 2022).

Igualmente, la secuenciación no solo ha permitido avances en la identificación y caracterización de los microorganismos presentes en una muestra (McMurdie & Holmes, 2013), también ha facilitado la determinación de su abundancia relativa (Bukin et al., 2019; Fogel et al., 1999), el análisis de su potencial metabólico (Langille et al., 2013) y su potencial interacción con el huésped (Amann et al., 1995). En general, el estudio de la microbiota es una herramienta eficaz para explorar la compleja relación entre los microorganismos y su huésped, lo que puede tener importantes implicaciones para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades.

1.1.5.1 Gen marcador ARNr 16S

El gen ARNr 16S forma parte de la subunidad ribosomal 30S, está presente en todas las células procariotas y consta de aproximadamente 1500 pares de bases. Posee nueve regiones variables (Figura 2) flanqueadas por regiones conservadas, que han permitido el desarrollo de cebadores universales para la amplificación por PCR de las secuencias objetivo. Por tanto, se ha convertido en el gen marcador más comúnmente utilizado para la asignación de géneros y, en algunos casos, para la identificación de especies bacterianas (Chakravorty et al., 2007; Langille et al., 2013; Rizal et al., 2020; Srinivasan et al., 2015).

Las regiones hipervariables del gen ARNr 16S presentan diferentes grados de variación. Cada región del gen ARNr 16S permite distinguir mejor entre algunos géneros, o incluso especies. Por lo tanto, una sola región no es suficiente para distinguir entre todas las bacterias (Chakravorty et al., 2007). Es por eso, que resulta mejor utilizar diferentes regiones para obtener una proporción más precisa de los taxones y así conocer una mayor proporción de la composición de la comunidad bacteriana (Bukin et al., 2019).

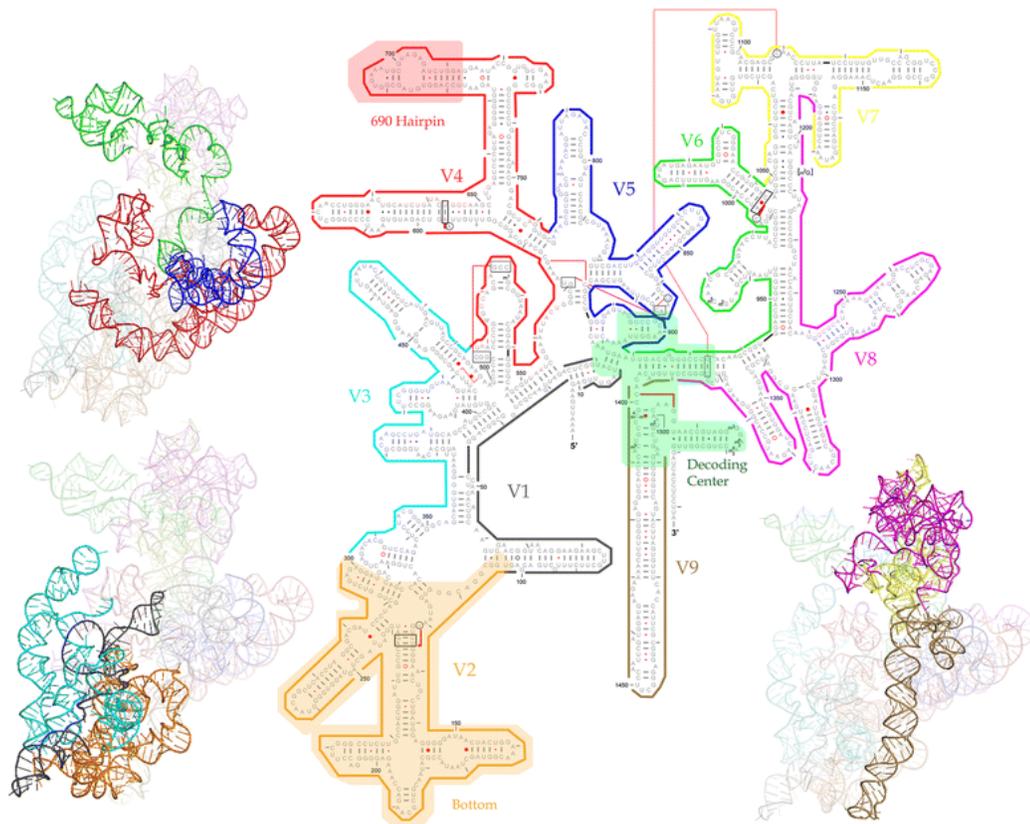


Figura 2. Estructuras 2D y 3D del gen ARNr 16S donde se identifican con los mismos colores, cada una de las regiones individuales. También se han coloreado algunos bloques para destacar estructuras importantes (Tomado de Yang et al., 2016) (B. Yang et al., 2016)

Se ha observado que la región V1 es útil para diferenciar entre *Staphylococcus aureus* (coagulasa positiva) y especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa (CONS, de sus siglas en inglés). Por otro lado, la región V6 no puede diferenciar entre *Escherichia sp.*, *Shigella sp.* y *Salmonella sp.*, ya que estas están estrechamente relacionadas. Sin embargo, las regiones V4 a V6 poseen la menor distancia geodésica (distancia entre dos vértices en un árbol filogenético) (B. Yang et al., 2016), lo que las convierte en regiones ideales para análisis bacterianos y filogenéticos (Bukin et al., 2019; Chakravorty et al., 2007; B. Yang et al., 2016).

1.1.5.2 Secuenciación de siguiente generación

En años recientes, las tecnologías de secuenciación han avanzado significativamente desde la propuesta original de Sanger y Coulson en 1975 (Sanger, 1975; Sanger & Coulson, 1975). El inicio de la secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés), se dio con la fundación de 454 Life Sciences y la introducción de la primera plataforma de secuenciación comercialmente disponible, la GS 20, en el año

2000. Esta plataforma estableció las bases para el futuro tecnológico, marcando la primera generación de plataformas NGS (Pareek et al., 2011; Rizal et al., 2020).

La segunda generación se caracterizó por la aparición de más competidores, que implementaron nuevos enfoques y ofrecieron la posibilidad de adquirir un mayor número de secuencias. La pirosecuenciación, propuesta por Roche y discontinuada en 2015, fue capaz de generar 500 millones de bases, siendo superada solo por la plataforma SOLiD, también discontinuada, con hasta mil millones de bases (Pareek et al., 2011; Rizal et al., 2020).

Dos plataformas NGS destacaron en esta segunda generación: Illumina y Ion Torrent. Estas utilizan la secuenciación por síntesis química y su habilidad para leer secuencias palindrómicas, las ha hecho populares en los laboratorios de NGS. Con el desarrollo de más plataformas NGS, se redujo significativamente los costos de secuenciación, pasando de un promedio de \$84.39 USD por Megabase (Mb) en un Roche GS Flex a \$5.97 USD por Mb para el Illumina-Solexa. Esto supuso una disminución de más del 90% en comparación con el costo original, lo que hace posible secuenciar miles de genes para obtener una mejor comprensión de los sistemas biológicos (Pareek et al., 2011; Rizal et al., 2020).

1.1.5.3 16SNGS

El desarrollo herramientas NGS, impulsó la secuenciación de ARNr 16S de siguiente generación (16SNGS), como algunos autores lo han señalado (Rizal et al., 2020). Esto gracias al aumento en el número de fragmentos secuenciados en un menor tiempo (L. Chen et al., 2014), incluso en muestras complejas (Rizal et al., 2020).

En términos generales, el análisis de comunidades bacterianas basado en el gen ARNr 16S, consta de tres pasos principales (Figura 3). En primer lugar, se extrae el ADN total de la comunidad a partir de una muestra, que puede ser de tejido, fluidos de un organismo o de muestras ambientales como suelo o agua (Rizal et al., 2020). Existen varios kits comerciales para la extracción, que utilizan tratamientos enzimáticos, ruptura térmica y/o lisis mecánica para el tratamiento de las células procariontes (Bjerre et al., 2019).

Después de la extracción, se cuantifica el ADN para determinar la cantidad, calidad y rendimiento (Bjerre et al., 2019; Head et al., 2014; Rizal et al., 2020; Sabat et al., 2017; Watanabe et al., 2018). En segundo lugar, se preparan las bibliotecas de los genes ARNr 16S. Esto implica la selección de una o varias regiones

variables (V1 a V9) para su amplificación, seguida de la adición de adaptadores que permiten que los fragmentos de ADN se unan a la superficie de las celdas del secuenciador (Bartram et al., 2011; Buermans & den Dunnen, 2014; Head et al., 2014; Rizal et al., 2020).

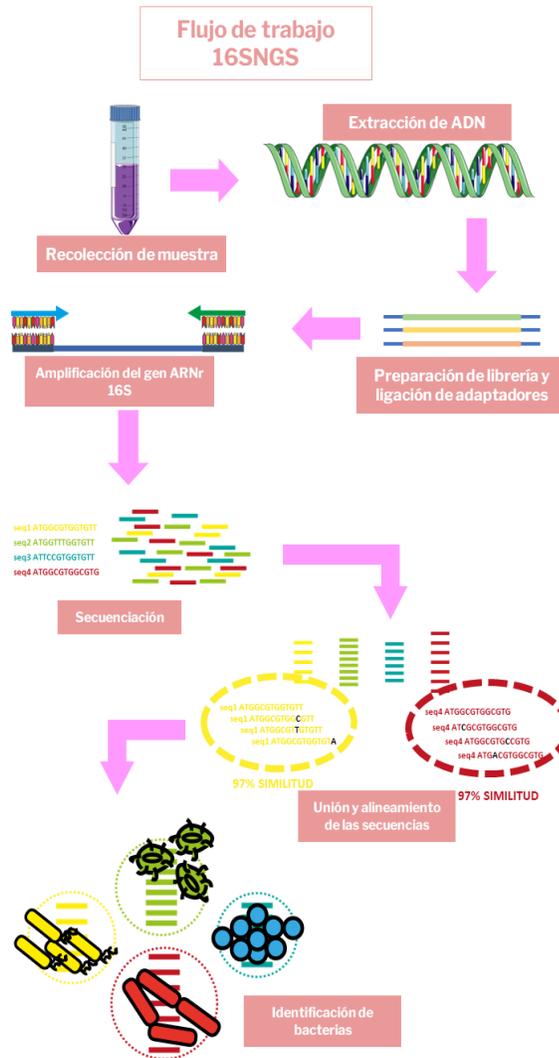


Figura 3. Flujo de trabajo de identificación bacteriana a través de 16SNGS. La extracción de ADN de las muestras se lleva a cabo en el primer paso del flujo de trabajo 16SNGS. Después de la preparación de la biblioteca, se realizará NGS de los fragmentos de ARNr 16S, seguido de un análisis bioinformático para identificar las bacterias. (Basado en lo publicado por Rizal et al., 2020 (Rizal et al., 2020))

Luego se realiza la cuantificación y normalización de los amplicones antes de la secuenciación (Illumina Inc., 2013; Pichler et al., 2018; Rizal et al., 2020; ThermoFisher Scientific, 2015). Finalmente, en el tercer paso, se lleva a cabo la secuenciación de los amplicones para su posterior análisis bioinformático (Pichler et al., 2018).

1.1.5.4 Análisis bioinformático 16S y asignación taxonómica

Después de la secuenciación, se realiza el preprocesamiento bioinformático de las lecturas sin procesar, conocido también como análisis de control de calidad (QC). Este proceso es esencial para los datos de secuenciación de amplicon (Jünemann et al., 2017; Rizal et al., 2020) y se compone de varias etapas con herramientas de libre acceso, que incluyen, aunque no forzosamente en el siguiente orden: [1] el empalme de las lecturas sentido y anti-sentido para los datos de secuenciación pareados (Maran & Davis G., 2022), para este fin existen programas como NGmerge (Gaspar, 2018), BBmerge (Bushnell et al., 2017) o PEAR (J. Zhang et al., 2014), [2] evaluación de la calidad de las secuencias antes y después del recorte con FASTQC (Andrew, S., 2010) o Quack (Thrash et al., 2018), [3] eliminación de adaptadores de secuenciación, cebadores de amplificación e identificadores de multiplexado (Jünemann et al., 2017) con Trimmomatic (Bolger et al., 2014), Cutadapt (Martin, 2011), PEAT (Y.-L. Li et al., 2015) o SeqPurge (Sturm et al., 2016), [4] filtrado o recorte de secuencias de baja calidad (Jünemann et al., 2017) con DUK-A (M. Li, 2011), UrQt (Modolo & Lerat, 2015), PRINSEQ (Schmieder & Edwards, 2011) o FastqCleaner (Roser et al., 2019), [5] detección de blancos de amplificación incorrectos mediante alineaciones (Jünemann et al., 2017) con mothur (Schloss et al., 2009), PyNAST (Caporaso, Bittinger, et al., 2010), QUIIME (Caporaso, Kuczynski, et al., 2010), NAST (DeSantis, Hugenholtz, Keller, et al., 2006) o RDP (Cole et al., 2009), [6] corrección de lecturas o eliminación de ruido (Huse et al., 2010; Jünemann et al., 2017) con UNOISE (Edgar & Flyvbjerg, 2015), AmpliconNoise (Quince et al., 2011), DUDE-Seq (B. Lee et al., 2017) o IPED (Mysara et al., 2016), [7] recorte de las lecturas a la misma longitud para su agrupamiento con las mismas herramientas que en el paso (Jünemann et al., 2017) [2], [8] agrupamiento de lecturas idénticas y selección de una lectura representativa junto con un conteo de su abundancia (de-replicación) (Jünemann et al., 2017) con MAFFT (Kato et al., 2005), UBLAST/USEARCH (Edgar, 2010), CD-HIT (Fu et al., 2012), DNACLUSt (Ghodsi et al., 2011) o MeShClust (Girgis, 2022), y [9] detección y eliminación de secuencias quiméricas con UCHIME2 (Edgar et al., 2011) o DECIPHER (Wright, 2016). Es importante eliminar las secuencias quiméricas porque pueden conducir a la generación de unidades taxonómicas artificiales en estudios posteriores (Jünemann et al., 2017; Rizal et al., 2020). Todas estas etapas mejoran significativamente la precisión de los análisis posteriores (Jünemann et al., 2017; Rizal et al., 2020).

En el análisis bioinformático de secuencias de bacterias/arqueas, se suelen construir unidades taxonómicas operativas (OTU, por sus siglas en inglés) agrupando secuencias con una similitud $\geq 97\%$ que corresponden a la misma especie (Bharti & Grimm, 2021; N.-P. Nguyen et al., 2016; Oulas et al., 2015; Rizal et al., 2020). Aunque también se pueden utilizar otras métricas de disimilitud (N.-P. Nguyen et al., 2016; Oulas et al., 2015). Hay diversas estrategias para generar OTU, como el enfoque [i] de novo que agrupa y

diferencia todas las lecturas sin referencia, pero es recomendable solo para conjuntos de datos pequeños debido al elevado esfuerzo computacional. Por otro lado, el enfoque de [ii] referencia cerrada se utiliza cuando los amplicones no se empalman y existe una colección de secuencias disponibles. Y el enfoque de [iii] referencia abierta se emplea cuando los amplicones empalman y existe una biblioteca de secuencias de referencia (Oulas et al., 2015). Todas estas estrategias se pueden encontrar en herramientas populares como QIIME, que genera tablas de OTU en formato BIOM (Caporaso, Kuczynski, et al., 2010; Rizal et al., 2020).

Sin embargo, existen otros proyectos como DADA2 (Callahan et al., 2016), Deblur (Amir et al., 2017), MED (Eren et al., 2015) y UNOISE2 (Edgar, 2016) que han desarrollado otras estrategias para mejorar la resolución taxonómica y corregir errores en el agrupamiento, como las variantes de secuencia de amplicon (ASV) (Rizal et al., 2020). Aunque la elección más adecuada para el análisis dependerá del tipo de datos y del usuario, se considera que DADA2 tiene la mayor resolución y sensibilidad (Allali et al., 2017; Prodan et al., 2020; Rizal et al., 2020), aunque produce una cantidad elevada de ASV espurios que pueden ser eliminados en análisis estadísticos posteriores (Prodan et al., 2020). Por lo tanto, DADA2 es una de las opciones más viables debido a su alta resolución (Prodan et al., 2020).

1.1.5.5 Inferencias del estado metabólico

La comprensión de la asociación entre microbios y sus funciones sigue siendo un reto y el análisis basado en marcadores genéticos no indica directamente las capacidades metabólicas de los microorganismos, a diferencia de la metagenómica. No obstante, con el crecimiento acelerado en la disponibilidad de genomas y el potencial de cómputo actual, es posible predecir las funciones microbianas a partir de datos de genes marcadores, como el gen 16S.

Diversas herramientas permiten predecir metagenomas utilizando datos de secuenciación del gen 16S y bases de datos de genomas de referencia (Langille et al., 2013). Esto reduce significativamente los costos, ya que el análisis de secuencias para metagenómica es considerablemente más caro que el de amplicon. Desde 2013 y hasta 2022, se han publicado alrededor de 20 herramientas o bases de datos disponibles que recuperan información sobre datos funcionales o ecológicos a partir de marcadores taxonómicos (16S o ITS) con un desarrollo de 2 hasta 4 por año (Djemiel et al., 2022), reflejando el interés constante en este tipo de herramientas las cuáles permiten una mejor comprensión de la diversidad funcional de las comunidades microbianas.

No obstante, es preciso mencionar que la secuenciación del gen marcador ARNr 16S presenta varias desventajas, incluyendo una resolución taxonómica limitada, ya que las plataformas de secuenciación de amplicones que se centran en las regiones variables del gen 16S no pueden distinguir entre especies estrechamente relacionadas. Además, la variación intragenómica, con múltiples copias polimórficas del gen 16S dentro del mismo genoma, puede complicar la clasificación taxonómica y causar errores de identificación. También existe un sesgo en la selección de subregiones del gen 16S, lo que afecta la precisión en la identificación de ciertos taxones bacterianos. Finalmente, el uso de subregiones fue un compromiso histórico debido a limitaciones tecnológicas pasadas, lo que puede no proporcionar suficiente variación de secuencia para una discriminación precisa a nivel de especie (Johnson et al., 2019).

1.1.6 Efecto de los hidrocarburos en las comunidades microbianas que habitan la piel y en el metabolismo de esta.

Diversos estudios han mostrado el impacto negativo de los derivados de hidrocarburos en el microbioma de la piel. Leung y colaboradores (Leung et al., 2020) encontraron una correlación entre la exposición a HAPs y la abundancia de ciertos comensales en la piel, un aumento en el número de genes asociados a las vías metabólicas relacionadas con la degradación de estos compuestos y con la aparición de lesiones en la piel (Figura 4). Así mismo, Sowada y colaboradores (Sowada et al., 2017) detectaron genes asociados con la degradación del benzo[a]pireno (B[a]P) en cultivos de bacterias obtenidos de muestras de piel expuestas al B[a]P así como de metabolitos altamente cito- y geno- tóxicos producto del catabolismo microbiano.

Recientemente, un estudio metabolómico *in vitro* evaluó el efecto de tres hidrocarburos en líneas celulares inmortalizadas de queratinocitos. Encontró alteraciones en metabolitos asociados a múltiples vías metabólicas, incluyendo la síntesis de lípidos, aminoácidos y aminas biogénicas (Potratz et al., 2016).

También se ha reportado que la exposición crónica a la contaminación ambiental, especialmente a los HAPs, está asociada con un aumento en los trastornos de la piel como desordenes en la pigmentación y la aparición de arrugas, así como con perfiles metabólicos alterados, incluyendo niveles elevados de N-acetilaminoácidos y gamma-glutamilaminoácidos. Además, el microbioma de la piel de personas que viven en áreas contaminadas muestra una mayor diversidad bacteriana y cambios microbianos específicos. Evidenciando que existe una correlación significativa entre los niveles de HAP en muestras de cabello y los cambios en los metabolitos de la piel, lo que sugiere un impacto directo de la contaminación en la salud cutánea (Misra et al., 2021).

Por otra parte, productos cosméticos que contienen derivados de hidrocarburos, como el talco, desodorante y crema facial, pueden alterar la diversidad química y microbiana de la piel, incluso varios días después de su aplicación, como demostró un estudio que empleaba la metabolómica y la secuenciación de ARNr 16S en sujetos sanos (Potratz et al., 2016). En este estudio, se encontró que el uso de estos productos afectaba la diversidad de bacterias y arqueas en la piel, además de que eran capaces de persistir después de su aplicación, evidenciando la capacidad que tenían de penetrar las estructuras celulares y acumularse.

Estos hallazgos indican una respuesta tanto del organismo como de la microbiota cutánea. Sin embargo, aún se desconoce la magnitud del impacto de la exposición a hidrocarburos en las comunidades microbianas de la piel, así como en el metabolismo de estas comunidades y de las células humanas, y las repercusiones que esto tendrá en la salud humana. La elucidación de estas interrogantes puede ayudar a comprender el riesgo potencial al que están expuestos los individuos en contacto con hidrocarburos en la piel. La unión de la metabolómica y la secuenciación de ARNr 16S puede ser una combinación útil para empezar a entender la respuesta de la microbiota de la piel al espacio químico que involucra las células de la piel.

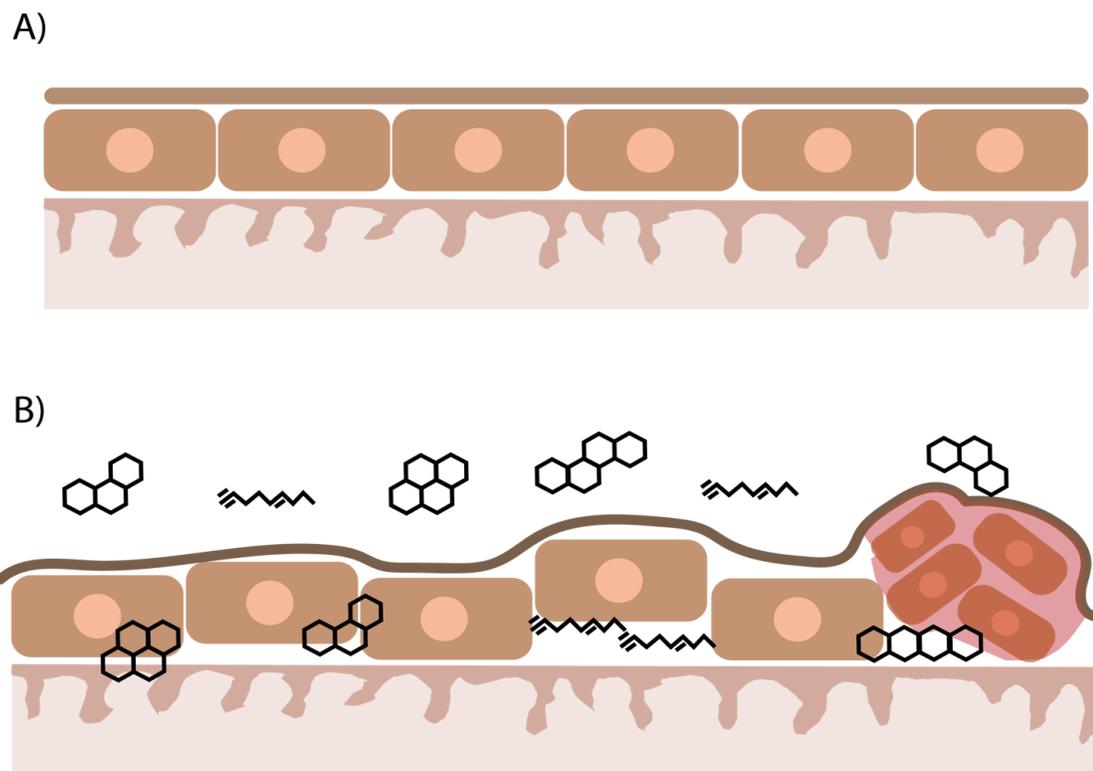


Figura 4. Diagrama esquemático que muestra el efecto de los hidrocarburos derivados del petróleo en las células de la piel. A) Baja/Nula exposición. B) Efectos debidos a la exposición y penetración de los hidrocarburos derivados del petróleo en las células de la piel, destacan la formación de irregularidades en la superficie de la piel (arrugas), desórdenes en la pigmentación y efectos inflamatorios.

1.2 Justificación

Los hidrocarburos derivados del petróleo, como solventes, plásticos, grasas y aceites industriales, son ubicuos en nuestro entorno. Debido a las diversas propiedades fisicoquímicas de estas moléculas, es factible que puedan ingresar y acumularse en nuestro cuerpo. La piel constituye uno de los principales sitios de contacto y acumulación de estos compuestos. Además, es un órgano con una alta actividad metabólica y hogar de diferentes bacterias, hongos y virus.

Debido al contacto constante con estos compuestos es importante comprender el efecto que tienen en las comunidades bacterianas de la piel y su impacto en la salud humana. Por todo lo anteriormente expuesto, este proyecto abordará estas interrogantes utilizando tecnologías de última generación y herramientas bio- y quimio- informáticas.

Esto permitirá una mejor comprensión del metabolismo de los hidrocarburos derivados del petróleo en la piel de personas expuestas crónicamente a ellos. Los resultados de este trabajo intentan definir la diversidad de metabolitos presentes en la piel, identificar aquellos relacionados con el metabolismo de hidrocarburos, analizar el impacto en las comunidades bacterianas que habitan la piel e inferir los riesgos para la salud de las personas con exposición ocupacional a este tipo de compuestos.

1.3 Hipótesis

Dado que se ha demostrado que la exposición crónica a hidrocarburos altera significativamente la composición de las comunidades microbianas y el metabolismo tanto de las bacterias como de las células humanas de la piel, se espera que el microbioma y el metaboloma de la piel de sujetos expuestos a hidrocarburos derivados del petróleo presenten diferencias notables en comparación con los de sujetos no expuestos.

Estas diferencias podrían manifestarse como cambios en la diversidad y abundancia de especies microbianas, así como en los perfiles metabólicos específicos. En particular, se anticipa que habrá alteraciones en la concentración de metabolitos clave, algunos de los cuales podrían estar asociados con daño celular, inflamación y otros procesos patológicos. Estas modificaciones en el metaboloma podrían tener implicaciones importantes para la salud cutánea y general de los individuos expuestos, incluyendo un mayor riesgo de enfermedades dermatológicas y sistémicas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la exposición crónica ocupacional a derivados de hidrocarburos sobre las comunidades bacterianas y el metabolismo de la piel.

1.4.2 Objetivos específicos

- Identificar los cambios en la diversidad y funcionalidad de las comunidades bacterianas de la piel entre sujetos expuestos y no expuestos derivados de hidrocarburos.
- Caracterizar las alteraciones en el perfil metabólico cutáneo inducidas por la exposición a derivados de hidrocarburos, comparando sujetos expuestos y no expuestos.
- Determinar las correlaciones entre las comunidades bacterianas y los metabolitos cutáneos, y su relevancia en la respuesta del hospedero a la exposición a derivados de hidrocarburos, comparando sujetos expuestos y no expuestos.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Selección de los grupos control e impactado por la presencias de hidrocarburos

Se seleccionaron diez hombres con edades de entre 22 y 55 años, cinco de los cuales tenían evidencia de exposición crónica a hidrocarburos derivados del petróleo. Como grupo control, se seleccionaron otros cinco sin evidente exposición crónica. Se excluyeron aquellos que tenían enfermedades diagnosticadas recientemente (< 1 año) o procedimientos visibles en la piel. Todos los voluntarios dieron su consentimiento reportado por escrito, el cual fue aprobado por el Comité de Bioética-CICESE para la realización de estudios con humanos (Anexo C).

2.2 Pretratamiento de los hisopos

Los hisopos utilizados para los análisis metabolómicos se lavaron con 2 mL de una disolución EtOH:H₂O (vol/vol), mientras que para los análisis de secuenciación de ARNr 16S se lavaron con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.6, 1 mM EDTA. Los hisopos fueron sumergidos en los respectivos líquidos contenidos en viales de vidrio y cubiertos con aluminio durante 2 horas. Se repitió el procedimiento dos veces más con una disolución fresca de 2 mL en cada caso. Antes de tomar cada muestra, se cambiaron los hisopos por disolución fresca.

2.3 Recolección de la muestra

Se recolectaron muestras con hisopos previamente humedecidos en disolución de EtOH/H₂O para los análisis metabolómicos o en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.6 1 mM EDTA para la secuenciación de ARNr 16S. Se tomaron cuatro muestras de cada sujeto experimental, dos por análisis (metabolómico y secuenciación) de la parte dorsal de la mano (mayor exposición aparente a hidrocarburos) y de la parte alta del brazo cerca del hombro (nula exposición aparente). Las muestras se recolectaron con movimientos lineales uniformes para asegurar la recolección en toda la superficie del algodón. Después, las muestras se dejaron en los viales con disolución durante 3 horas para que liberaran los compuestos adsorbidos.

2.4 Análisis de amplicon ARNr 16S

2.4.1 Extracción de material genético y secuenciación

Se extrajo el ADN de las muestras del grupo control y el expuesto utilizando un kit de aislamiento de ADN PowerMax Soil (MoBio, Carlsbad, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ADN extraído se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific, EE. UU.).

Para la amplificación de la región V3–V4 del gen ARNr 16S, se emplearon los cebadores S-D-Bact-0341-b-S-17 y S-D-Bact-0785-a-A-21 (Klindworth et al., 2013). La reacción de PCR se llevó a cabo siguiendo un protocolo modificado (Anexo B) basado en las directrices del sistema Illumina MiSeq (San Diego, CA, EE. UU.) (Caporaso et al., 2012). Los amplicones generados fueron etiquetados y agrupados en concentraciones equimolares para su posterior secuenciación utilizando el sistema Illumina MiSeq

2.4.2 Asignación taxonómica y análisis general de la comunidad bacteriana

Los análisis siguientes se realizaron en el lenguaje de programación R V3.6.1 e implementados con RStudio V1.14.1106, a menos que se indique algo distinto.

Utilizamos el pipeline DADA2 (Callahan et al., 2016) para realizar el filtrado y recorte de las lecturas, inferir las variantes de secuencia de los amplicones (ASVs) y asignar la taxonomía a las ASVs. Recortamos tanto las lecturas forward como las reverse a 240 bases ($\text{truncLen}=240$). Además, truncamos las lecturas en la primera instancia de una puntuación de calidad de <2 ($\text{truncQ}=2$), recortamos las lecturas que contenían >2 errores esperados ($\text{maxEEFor}=2$; $\text{maxEERev}=2$) y descartamos las lecturas con bases ambiguas ($\text{maxN}=0$).

Estimamos un modelo de error paramétrico utilizando aprendizaje automático no supervisado en 100 millones de secuencias para las lecturas forward y reverse por separado. Para cada muestra, desreplicamos las lecturas de secuenciación e inferimos las ASVs utilizando el algoritmo de inferencia de muestras DADA2 y el modelo de error estimado. Se utilizó el pseudo-pooling para la inferencia de muestras para aumentar la sensibilidad a las ASVs a bajas frecuencias. Las secuencias desruidizadas se fusionaron utilizando las

lecturas forward y reverse inferidas. Se identificaron y eliminaron las secuencias quiméricas utilizando la función `removeBimeraDenovo` (`method="consensus"`).

Asignamos una taxonomía a cada ASV utilizando la versión 138 de la base de datos SILVA (Quast et al., 2013). Eliminamos los singletons y las ASVs clasificadas como mitocondrias, así como las ASVs que podrían estar presentes en los hisopos o en el kit Power Soil.

La matriz de ASV generada previamente se normalizó utilizando el método de la media recortada de los valores M (TMM) en EdgeR (Robinson et al., 2010). La normalización de los datos es importante para corregir las diferencias en la profundidad de secuenciación y las variaciones técnicas entre las muestras. Se eligió edgeR para la normalización debido a su capacidad para manejar datos de alta dimensionalidad y su robustez frente a datos dispersos.

Después de la normalización, se imputaron los valores faltantes en la matriz normalizada utilizando el algoritmo MBimpute (Jiang et al., 2021). La imputación de valores faltantes es importante para evitar que se pierdan datos valiosos en el análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se analizaron con Phyloseq V1.30 (McMurdie & Holmes, 2013) y Vegan V2.5.6 (Oksanen et al., 2015), y se graficaron con ggplot2 V3.3.3. La diversidad alfa se calculó con el índice de Shannon, y la diferencia en la estructura de la comunidad se calculó mediante un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) utilizando la distancia Unifrac (ponderada y no ponderada), para determinar las diferencias entre los grupos evaluados (Cohorte (Expuestos vs No expuestos) y Subcohorta (Exposición o no, por sitio corporal)). Se calcularon y graficaron los promedios de los resultados obtenidos de las distancias a cada punto en el NMDS mediante el centroide. La abundancia relativa se implementó a nivel de género, seleccionando a los 15 taxones más abundantes.

2.4.3 Análisis estadísticos en los datos de microbioma

Para realizar el análisis estadístico univariado y multivariado en los ASVs, se utilizó el lenguaje de programación R a través de Rstudio y Microbiomeanalyst (Lu et al., 2023). En primer lugar, se extrajo la matriz de ASVs generada de los análisis con DADA2. La matriz contenía información sobre la presencia y abundancia de cada ASVs en las diferentes muestras.

Con la matriz de datos completa, se procedió a realizar una prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos. La significancia se estableció en 0.05, lo que significa que se rechazó la hipótesis nula si el valor de p era menor que 0.05.

2.4.4 Inferencias del estado metabólico de las comunidades bacterianas

Para inferir las rutas metabólicas, se llevó a cabo un análisis con el uso de QIIME V1.9.1¹⁰¹. Este método utiliza Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) y la base de datos GreenGenes (DeSantis, Hugenholtz, Larsen, et al., 2006) para hacer la predicción del estado metabólico. Los OTU se generaron mediante la unión de secuencias utilizando el plugin VSEARCH (Rognes et al., 2016) aplicado al objeto que contiene las secuencias demultiplexeadas, las cuales se obtuvieron a partir de secuencias en formato fastq. Las secuencias unidas se filtraron en función de los puntajes de calidad y luego se desreplicaron, colapsando las secuencias al 100% de similitud. Finalmente, las secuencias desreplicadas se agruparon utilizando el modelo de referencia cercana con un 97% de similitud con la base de datos GreenGenes.

Los resultados obtenidos se evaluaron con PICRUSt V1.1.4 (Langille et al., 2013). En primer lugar, se normalizó la tabla de OTU por número de copias de genes. Posteriormente, se predijeron las funciones metagenómicas, generando un archivo que contiene los ortólogos de la base de datos de la Enciclopedia de Genes y Genoma de Kyoto (KEGG), la cual es una base de datos que ha sido curada manualmente para integrar una gran variedad de entidades biológicas, organizadas en diferentes categorías de información que son: sistemas, genómica, química y de salud (Kanehisa & Goto, 2000). Finalmente, los resultados se visualizaron (utilizando el esquema de clasificación KEGG Orthology [KO]) y se analizaron con el paquete de software STAMP v2.1.3 (Parks et al., 2014).

2.5 Análisis metabolómicos

El método de extracción y análisis descrito a continuación está basado en cromatografía de líquidos de fase reversa (RP-LC) acoplada a espectrometría de masas-masas (MS/MS). La cual tiene una afinidad predominante por metabolitos hidrofóbicos debido a la naturaleza de la columna C18 utilizada. Esta columna retiene preferentemente compuestos no polares o ligeramente polares, permitiendo su separación efectiva. Sin embargo, la fase móvil utilizada (H₂O:ACN) y el gradiente de elución permiten también la detección de un buen número de compuestos polares. Esto se debe a que el acetonitrilo, un

solvente orgánico fuerte, puede eluir metabolitos polares que interactúan menos con la fase estacionaria hidrofóbica. Por lo tanto, aunque el método es ideal para metabolitos hidrofóbicos, su versatilidad permite la detección de una amplia gama de compuestos, incluyendo aquellos con características polares.

2.5.1 Procesamiento de muestras

Se transfirió el contenido de los viales para los análisis metabolómicos a tubos cónicos de 1.5 mL y se concentraron en el equipo SpeedVac, utilizando los siguientes parámetros: sin temperatura de calentamiento, 0.01 de tiempo de calentamiento, 4 horas de tiempo, 0.01 de presión y rampa 1.

Una vez concentradas, las muestras se disolvieron en 200 μ L de disolución H₂O:ACN (5:95 V/V) grado masas y se agitaron durante 1 minuto con ayuda de un Vortex. Después, se centrifugaron a 4 °C durante 10 min a 20800 rcf (14000 rpm).

Finalmente, se transfirió el 90% de la disolución a otro tubo cónico, el cual fue rotulado como "RFI" (Ready for Inject) y se almacenó a -80°C.

2.5.2 Adquisición de datos por LC-MS/MS

Se transfirieron 20 μ L de las disoluciones rotuladas como RFI a los viales de inyección, y se preparó un vial con 200 μ L de fase móvil RFI como blanco. A continuación, se inyectaron 2 μ L de las muestras en un equipo de cromatografía de líquidos (CL) Agilent 1260 Infinity, utilizando una columna ProtID-Chip-43 II (C18, 43 mm, 300 Å, tamaño de partícula de 5 μ m) equipada con una columna de enriquecimiento de 40 nL para separar las moléculas.

Las fases móviles utilizadas fueron H₂O con 0.1% de Ácido Fórmico (FA) como disolución A y Acetonitrilo (ACN) con 0.1% de FA como disolución B. Se empleó un gradiente que consistió en un incremento lineal de 5% hasta 70% de fase móvil B en 15 minutos a un flujo de 200 nL/min. El tiempo total de corrida fue de 25 minutos, incluyendo el re-equilibrio de la columna a las condiciones iniciales.

Las moléculas eluidas se introdujeron a un espectrómetro de masas Agilent 6530A Q-TOF (Quadrupole Time-Of-Flight) a través de la interfaz Chip Cube-CL. Los espectros se adquirieron de manera automática

dependiente de datos en modo positivo, utilizando un rango de masa de 100-1800 m/z a una velocidad de 4 espectros/s para los MS1. Los espectros de MS1 que alcanzaron 500 cps se seleccionaron para la adquisición de MS/MS (50-1800 m/z) a una velocidad de 3 espectros/s y una abundancia blanco de 25,000 cps. Se seleccionaron un máximo de 5 iones precursores para cada ciclo de MS/MS con exclusión activa después de 2 espectros. Las energías de colisión se calcularon con base en la ecuación $CE = [(3.7 \times m/z) / 100] + 2.5$.

Se estableció la temperatura de la fuente de gases en 325 °C y el flujo de gas en 5 L/min. El equipo se calibró diariamente para garantizar una precisión de masa <5 ppm.

2.5.3 Procesamiento quimioinformático de los datos

La metodología utilizada se basó en el reporte de Moreno Ulloa y colaboradores (Moreno-Ulloa et al., 2020), que consta de tres aproximaciones principales: (1) la detección, extracción y alineamiento de los potenciales metabolitos en las muestras, (2) análisis estadísticos univariados y multivariados, y (3) anotación de metabolitos.

Los archivos crudos en formato propietario (.d) obtenidos del espectrómetro de masas Agilent 6530A Q-TOF se transformaron a un formato genérico (.mzML) mediante el software ProteoWizard (Holman et al., 2014) y se procesaron con el software MZmine 2.34 (Pluskal et al., 2010). Para la detección del centroide de masa, se utilizó un nivel de ruido de 200 para los datos del MS1 y 15 para los datos del MS2. La creación de cromatogramas se realizó mediante el algoritmo ADAP (Automated Data Analysis Pipeline) (Myers et al., 2017), con los siguientes parámetros: cantidad mínima de 5 scans consecutivos, altura máxima mínima de 200 y altura mínima de 300.

La deconvolución de los cromatogramas se efectuó mediante el algoritmo ADAP (Myers et al., 2017), utilizando los siguientes parámetros: límite del cociente entre la intensidad de la señal y el ruido 7, altura mínima 300, límite del cociente entre el coeficiente y área del pico 10, longitud del pico de 0.1 a 2.5 minutos y longitud de la onda base de 0.01 a 0.05.

Tras el procesamiento y la generación de los cromatogramas, se agruparon los isótopos presentes en los datos utilizando los siguientes parámetros: tolerancia m/z de 0.02, ppm de 0, tolerancia de tiempo de retención (RT) de 0.5, forma monótona sí y máxima carga de 1. Consecuentemente, se alinearon todas las

muestras utilizando el algoritmo RANSAC (Fischler & Bolles, 1981), con los siguientes parámetros: tolerancia m/z de 0.02, ppm de 0, tolerancia RT de 0.5, tolerancia RT después de la corrección de 0.25, iteraciones de RANSAC de 2000, número mínimo de puntos (%) de 20 y valor de umbral de 1.

Para reducir la falta de valores en los picos alineados, ya sea porque se encuentran por debajo de los umbrales, presentan una forma diferente o tienen cambios en su RT o m/z, se aplicó la función de "buscador de picos" con los siguientes parámetros: tolerancia de intensidad del 20%, tolerancia m/z de 0.02, ppm de 0, tolerancia RT de 0.25 y puntos mínimos de datos de 3. Posteriormente, se eliminaron los picos duplicados mediante el módulo proporcionado en el software, utilizando el modo de filtrado de promedio viejo, tolerancia m/z de 0.006, ppm de 0 y tolerancia RT de 0.1. Finalmente, se eliminaron los iones detectados en el blanco que tenían una intensidad mayor a 850 de los iones detectados en las muestras.

Se exportaron distintos archivos, que incluyen una tabla de todos los picos alineados y su abundancia por muestra, una tabla de picos que contienen únicamente un MS2 asociado y su abundancia por muestra, un archivo en formato .MGF que únicamente contiene los iones que contaban con un MS2 asociado para los análisis en GNPS y un archivo en formato .MGF que únicamente contiene los iones que contaban con MS2 asociado para los análisis en SIRIUS (Dührkop et al., 2019).

2.5.4 Análisis estadísticos en los datos de metabolómica

Para realizar los análisis estadísticos univariantes y multivariante en los potenciales metabolitos a nivel MS1, se empleó el lenguaje de programación R a través de Rstudio y la plataforma Metaboanalyst (Pang et al., 2022). En primer lugar, se filtraron los datos para eliminar los potenciales metabolitos (atributos a partir de este punto) que tenían valores faltantes en más de 17 muestras de las 23 totales.

Una vez filtrados los datos, se procedió a normalizarlos por cuantiles utilizando la librería NormalyzerDE (Willforss et al., 2019). La normalización por cuantiles se realiza dividiendo los valores de cada feature por su percentil correspondiente. Esta normalización es útil para corregir las diferencias en la intensidad de los atributos entre las muestras. Después de la normalización, se imputaron los valores faltantes utilizando el algoritmo Random Forest (RF) en la página web de METimp (Wei et al., 2018). La imputación de valores faltantes es importante para evitar que se pierdan datos valiosos en el análisis estadístico.

Con la matriz de datos completa, se procedió a realizar un análisis paramétrico porque se observó que las distribuciones de los datos seguían una distribución normal, utilizando un T-test para las comparaciones entre grupos. La significancia se estableció en 0.05, lo que significa que se rechazó la hipótesis nula si el valor de p era menor que 0.05.

Igualmente, se realizó un análisis multivariado utilizando PCA y un mapa de calor. El PCA es una técnica que permite reducir la dimensionalidad de los datos al proyectarlos en un espacio de menor dimensión mientras se mantiene la mayor cantidad posible de variabilidad en los datos. El mapa de calor, por otro lado, es una visualización que permite mostrar la correlación entre los diferentes atributos en la matriz de datos. Para el análisis estadístico en la abundancia de las clases químicas de los metabolitos. Las abundancias se agruparon por clase química, se transformaron en logaritmo base 2, se normalizaron, imputaron y clasificaron con Canopus. Se sumó el área bajo la curva para cada clase, se determinó su media y se realizó una prueba T paramétrica con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

2.5.5 Anotación de metabolitos

Se realizó la anotación automática de metabolitos a nivel de estructura utilizando la plataforma web Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) (Aron et al., 2020), siguiendo el nivel de clasificación 2 de Metabolomics Standards Initiative (MSI) (Schymanski et al., 2014), y herramientas *in silico* como MolDiscovery (Cao et al., 2021), CSI: FingerID (Dührkop et al., 2015) y DEREPLICATOR+ (Mohimani et al., 2018) (MSI, nivel 3). Recuperamos las clases químicas de los metabolitos por grupo utilizando la herramienta CANOPUS (Dührkop et al., 2021) integrada en el software SIRIUS (Dührkop et al., 2019) versión 4.9.12.

La red molecular se creó utilizando una puntuación mínima de coseno de 0,6 y un mínimo de 4 iones de fragmentos compartidos. Para la búsqueda y anotación en la biblioteca, se requirió un mínimo de 4 picos coincidentes con un umbral de puntuación de 0,6.

Para mejorar la anotación de los metabolitos no identificados automáticamente a través de la coincidencia espectral, utilizamos la herramienta *in silico* Network Annotation Propagation (NAP) (da Silva et al., 2018) disponible en GNPS. NAP utiliza los resultados de las redes moleculares para reevaluar las listas *in silico* de estructuras potenciales. Los parámetros para NAP fueron: aductos $[M+NH_4]^+$, $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ y $[M+K]^+$,

valor de coseno 0,6, adquisición positiva y tolerancia m/z de 10 ppm. Todos los parámetros se describen en: <https://proteomics2.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=5c91d7ff115a4522aaa1f4c255863d84>.

Todas las anotaciones potenciales obtenidas a través de la biblioteca GNPS y NAP se categorizaron automáticamente en una clase química utilizando la nomenclatura de ontología química Classyfire (Djoumbou Feunang et al., 2016). La integración de las salidas de FBMN, NAP y Classyfire se llevó a cabo utilizando el flujo de trabajo MolNetEnhancer (Ernst et al., 2019), que se ejecutó en Python utilizando el paquete MolNetEnhancer. La red de salida generada se visualizó en Cytoscape (v3.10.1) y se coloreó a nivel de subclase química.

2.6 Determinación de la interacción de los datos metabolito-bacteria

Para determinar el origen de los metabolitos e impacto que podrían tener en el microbioma se utilizó M²IA (Ni et al., 2019). Ambas combinan una amplia variedad de métodos de análisis estadísticos univariados y multivariados para la integración de los datos y el correspondiente análisis de correlación. De manera general, M²IA realiza estudios estadísticos y posteriormente un análisis funcional recurriendo para ello a la base de datos de vías metabólicas KEGG (Kanehisa & Goto, 2000) y así proporcionar conocimientos profundos de las correlaciones biológicas, entre los microorganismos identificados y una reacción metabólica o vía metabólica específica.

Para analizar los datos de metabolitos, utilizamos el marco de datos previamente normalizado e imputado a nivel MS1, seleccionando solo las características identificadas (con MS2 asociado). Para los datos del microbioma, empleamos la tabla ASV prenormalizada e imputada junto con su información taxonómica correspondiente y el archivo de secuencia de referencia producido a partir del análisis DADA2.

Nos abstuvimos de aplicar procedimientos adicionales de filtrado, imputación y normalización, ya que los datos ya habían pasado por una prenormalización e imputación robusta. Para comparar los diferentes grupos de manera univariada, empleamos la prueba t de Student para los conjuntos de datos de metaboloma y U de Mann-Whitney para microbioma, considerando un valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Seleccionamos los análisis de Procrustes y Co-inercia para proporcionar una descripción general de la similitud entre los conjuntos de datos de microbioma y metaboloma. Estas técnicas estadísticas

multivariadas exploran correlaciones entre distintos conjuntos de datos ómicos mediante un enfoque basado en permutaciones que considera múltiples coordenadas o componentes principales (Paliy & Shankar, 2016). Esta metodología permite una evaluación integral de las correlaciones entre diversos tipos de datos ómicos.

Para explorar las correlaciones entre las bacterias diferencialmente abundantes (a nivel de género) y la abundancia de metabolitos, empleamos el análisis de correlación de Spearman, siguiendo las recomendaciones de los desarrolladores de M2IA. Los valores de corte del coeficiente de correlación se definieron como $R > 0$ y $p < 0,05$.

Los resultados se representaron visualmente de dos maneras:

- Diagrama de cuerdas: Para identificar géneros bacterianos que exhibieron correlaciones con diferentes clases de metabolitos.
- Mapas de calor: Para identificar grupos de bacterias y metabolitos con correlaciones significativas.

Capítulo 3. Resultados

En el estudio piloto, se analizaron las muestras de piel recolectadas de diez participantes masculinos. Las características generales de los sujetos se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros antropométricos y de exposición a HCs de los sujetos de estudio

	Expuestos	No expuestos	Valor-p (prueba t)
Edad (años)	37.6 [25-49]	39 [22-55]	0.9
Altura (m)	1.69 [1.62-1.77]	1.76 [1.69-.187]	0.09
Peso (kg)	74 [69-79]	85 [53-108]	0.09
Tiempo de exposición a HCs (años)	16.2 [5-35]	Sin exposición	
Índice de masa corporal (kg/m²)	26.3 [22-30.1]	27.1 [18-31.7]	0.8
Fuente de exposición a HCs	Aceites industriales y comerciales, grasas, disolventes (para lavado de manos), lubricantes	Ninguna	
Tiempo desde el último lavado de manos	4.1 [2-5]	6.2 [1-19]	0.5

3.1 Análisis inicial del microbioma

En nuestro análisis de amplicones, detectamos exitosamente 2,584 variantes de secuencia de amplicones (ASVs) asociadas con bacterias (Anexos, Tabla 5). Estas ASVs se clasificaron en 23 fillos distintos, proporcionando una comprensión más completa de la diversidad bacteriana en nuestras muestras.

Resulta relevante comentar que el control de hisopos contenía material genético (resultado no mostrado) asociado principalmente a bacterias del Filo Proteobacteria (se ha sugerido que se reconsidere como Superfilo (Yarza et al., 2014)). Su presencia puede deberse a una contaminación en los kits o en los hisopos, pese a que estos últimos se esterilizaron al igual que, la solución reguladora usada para la extracción. Se ha reportado la presencia de contaminación por *Pseudomonas spp.* y *Escherichia coli*, en diversos kits de extracción (Bjerre et al., 2019), uno de los cuáles, es de la misma marca del que se empleó en este análisis.

Igualmente, esto no representó un problema para los análisis posteriores debido a que, el ADN bacteriano detectado en el blanco fue eliminado de las demás muestras en los análisis bioinformáticos posteriores.

3.2 La exposición a HCs es el principal impulsor de la variación del microbioma

Por ello, para nuestra exploración inicial del microbioma, investigamos la diversidad bacteriana (diversidad alfa) utilizando el análisis de diversidad de Shannon a nivel de variante de secuencia de amplicon (ASV). Comparamos tanto el nivel de cohorte como los niveles de subcohorte. A nivel de cohorte (Figura 5A), observamos diferencias en los perfiles del microbioma de la piel. Las muestras E exhibieron una mayor diversidad en comparación con las muestras de NE ($H = 5.419$ y $H = 5.069$, respectivamente). Algo similar también ocurrió a nivel de subcohorte (Figura 5B), donde específicamente las muestras EH mostraron una mayor diversidad ($H = 5.551$) en comparación con las NEH ($H = 5.061$), EA ($H = 5.287$) y NEA ($H = 5.077$).

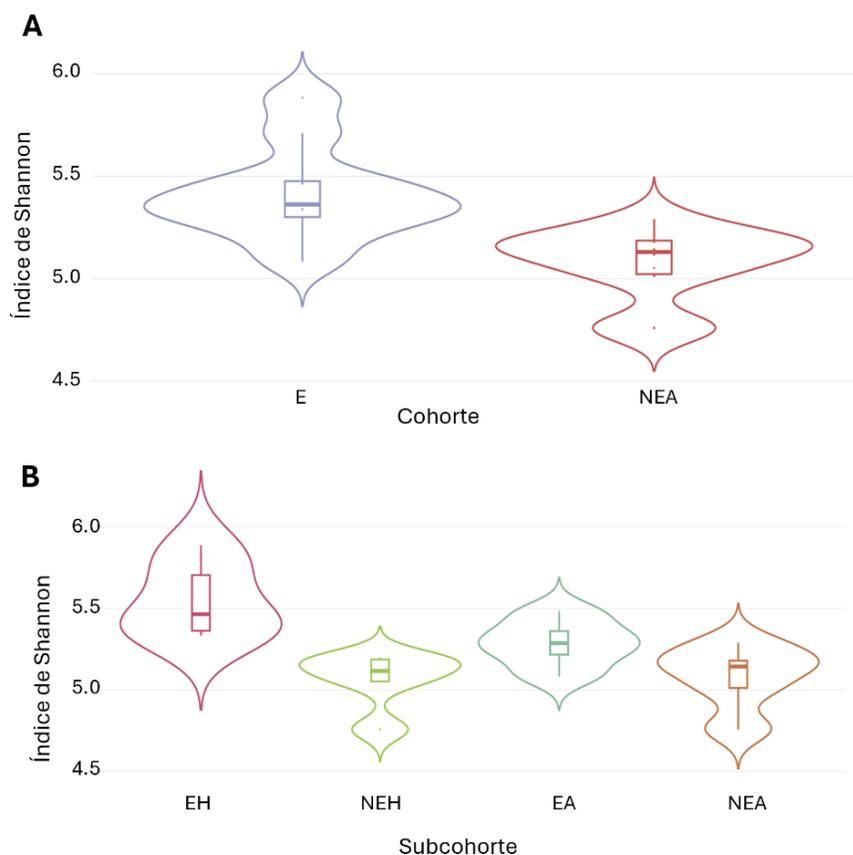


Figura 5. Gráfico de caja/violín de la métrica de la diversidad alfa en las muestras de piel de sujetos expuestos y no expuestos a hidrocarburos derivados del petróleo a nivel de: A) Cohorte donde: E = Expuestos y NE = No Expuestos, y B) Subcohorte donde: EA=Brazo expuesto, NEA=Brazo no expuesto, EH=Mano expuesta y NEH=Mano no expuesta. Las medianas están marcadas por las líneas horizontales dentro de los recuadros, los bigotes representan las desviaciones estándar.

Una prueba t demostró que existían diferencias significativas entre las medias de cada grupo para la métrica de diversidad alfa (índice de Shannon) a nivel de Cohorte ($p = 0.001$). Con respecto al nivel de Subcohorte (Tabla 3), la prueba t utilizando la misma métrica anterior evidenció que solo las comparaciones entre EH versus NEH (no pareada), EH versus NEA (no pareada), y EH versus EA (pareada) presentaban diferencias significativas ($p = 0.001$, $p = 0.001$ y $p = 0.038$ respectivamente). Esto sugiere que la exposición a hidrocarburos puede estar asociada de forma significativa en la variación del microbioma en la superficie de la piel.

Tabla 3. Comparación de dos grupos del índice de diversidad de Shannon a nivel de subcohorte.

Comparación	Tipo	Valor p^a
NEA vs NEH	Pareada	0.928
NEA vs EA	No pareada	0.1056
NEA vs EH	No pareada	0.0013
NEH vs EA	No pareada	0.0845
NEH vs EH	No pareada	0.0010
EA vs EH	Pareada	0.038

Abreviaturas: EH, manos de individuos expuestos; NEH, manos de individuos no expuestos; EA, brazos de individuos expuestos, y NEA, brazos de individuos no expuestos. Los valores p en negrita indican significancia.

3.3 Desenmascarando el efecto de los HCs en la diversidad β

Para investigar el impacto potencial de la exposición a hidrocarburos de petróleo en la diversidad beta, se generaron matrices de distancia utilizando las distancias UniFrac ponderadas y no ponderadas entre todas las muestras a nivel de Cohorte y subcohorte. Los gráficos de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) revelaron patrones de agrupamiento distintos basados en la condición de exposición tanto a nivel de Cohorte como de subcohorte (Figuras 6 y 7), proporcionando información sobre la influencia de la exposición a HCs en la composición de las comunidades microbianas de la piel.

Para explorar más esta relación, realizamos pruebas adonis por pares utilizando distancias UniFrac ponderadas y no ponderadas (Anexos, Tabla 6). Se observaron diferencias significativas solo con distancias UniFrac no ponderadas a nivel de Cohorte (NE vs. E, $p = 0.005$), indicando un efecto significativo derivado de la exposición a HCs en la composición del microbioma de la piel. A nivel de subcohorte, ocurrió algo similar, solo se encontraron disimilitudes significativas utilizando las distancias UniFrac no ponderadas, entre sitios específicos de la piel y la exposición a derivados del petróleo (NEA vs. EH, $p = 0.044$ y NEH vs.

EH, $p = 0.049$), mientras que no se detectaron diferencias significativas con distancias UniFrac ponderadas. Estos hallazgos sugieren que la exposición a HCs afecta la composición general del microbioma de la piel pero no las abundancias relativas de los taxones microbianos.

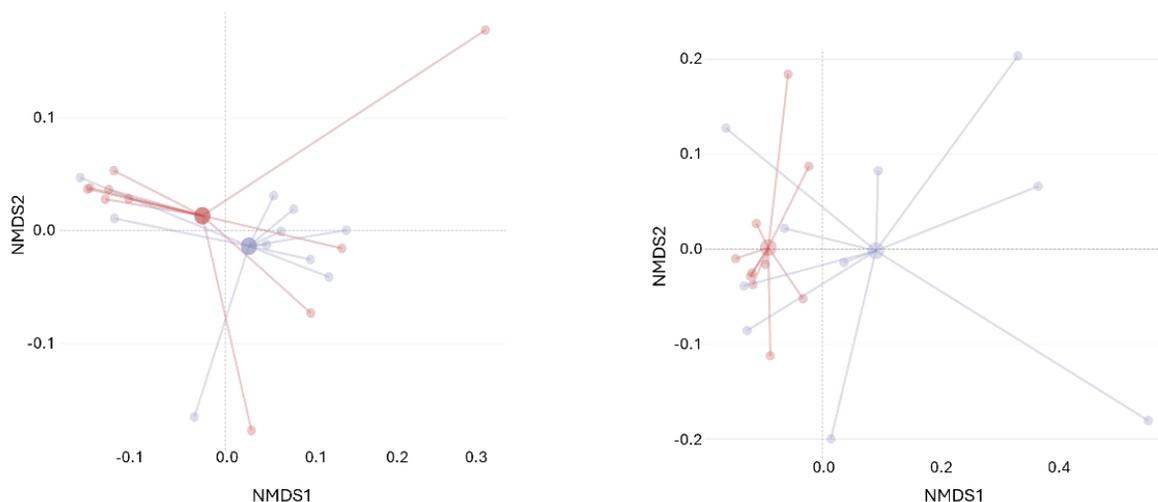


Figura 6. Análisis de NMDS con las distancias UniFrac ponderadas (izquierda) y no ponderadas (derecha) entre las comunidades microbianas de muestras de piel de sujetos expuestos y no expuestos a hidrocarburos derivados del petróleo a nivel de cohorte. La cohorte se divide en sujetos expuestos (E) y no expuestos (NE). Cada muestra se representa mediante un círculo pequeño y el centroide, definido como la distancia media a todas las muestras para esa condición, se representa mediante un círculo de mayor tamaño.

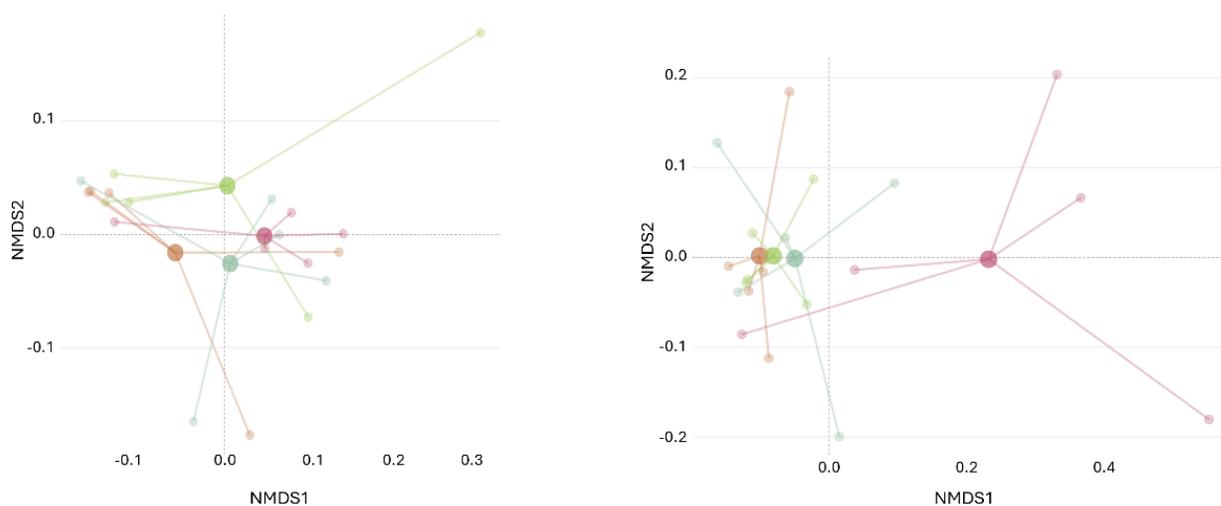


Figura 7. Análisis de NMDS con las distancias UniFrac ponderadas (izquierda) y no ponderadas (derecha) entre las comunidades microbianas de muestras de piel de sujetos expuestos y no expuestos a hidrocarburos derivados del petróleo a nivel de subcohorte. La subcohorte se divide en brazo expuesto (EA), brazo no expuesto (NEA), mano expuesta (EH) y mano no expuesta (NEH). Cada muestra se representa mediante un círculo pequeño y el centroide, definido como la distancia media a todas las muestras para esa condición, se representa mediante un círculo de mayor tamaño.

3.4 Composición de la comunidad bacteriana

De los veintitrés filos identificados en este estudio (Anexos, Tabla 7). El filo Proteobacteria constituyó la mayor proporción, representando el 64.80% de las ASVs detectadas. A este le siguió el filo Actinobacteria, que comprende el 15.63% de las ASVs. El filo Firmicutes también mostró una representación sustancial, representando el 11.63% de las ASVs. El filo Bacteroidota representó el 4.26% de las ASVs detectadas, y el filo Cyanobacteria contribuyó con el 1.47% a la diversidad bacteriana total. Estos cinco filos combinados representaron más del 95% de los filos detectados en todas las muestras.

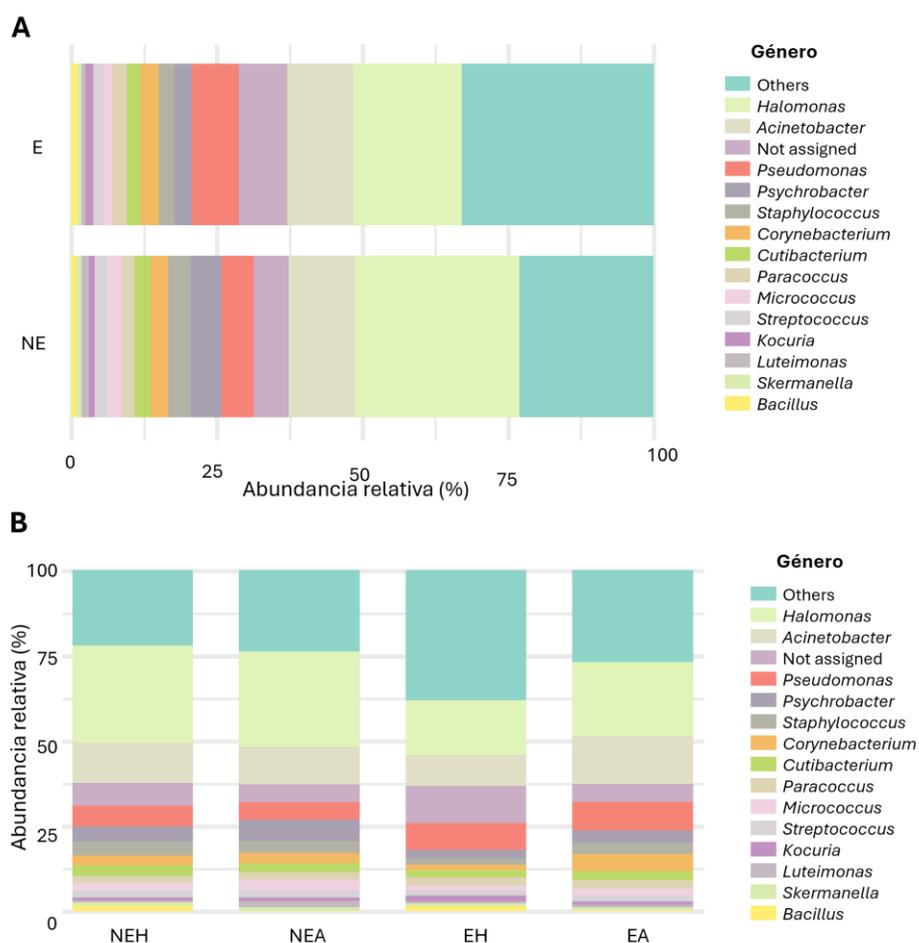


Figura 8. Gráfico de barras de los 15 géneros bacterianos más abundantes a nivel de cohorte (A) y subcohorte (B).

Profundizando, este estudio identificó 398 géneros distintos (Anexos, Tabla 8). Los géneros más abundantes fueron *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Psychrobacter*, *Paracoccus*, *Cutibacterium*, *Kocuria*, *Luteimonas*, *Micrococcus*, *Skermanella* y *Streptococcus*

(Figura 11). Estos géneros representaron más del 70% de la composición de la muestra en sujetos NE, tanto a nivel de cohorte como de subcohorte (Figuras 8A y 8B).

Para las muestras de sujetos E, estos géneros describieron menos del 75% de la abundancia relativa de la comunidad bacteriana en la superficie de la piel (Figuras 8A y 8B). Estos hallazgos son concordantes con los resultados previos, mostrando que existe un aumento en la diversidad de bacterias en la piel como resultado de la exposición a hidrocarburos derivados del petróleo.

3.5 Cambios en la diversidad de bacterias presentes en la piel

A fin de corroborar si existían cambios en la composición de la comunidad microbiana, realizamos un gráfico Upset, esta es una técnica de visualización utilizada para representar las intersecciones de conjuntos. Con ella pudimos determinar aquellos géneros bacterianos que eran únicos para cada grupo. Se observó que las muestras de mano de sujetos expuestos a HCs presentaban 26 géneros bacterianos únicos (Figura 12). Así mismo, existían cuatro géneros bacterianos que se compartían solo entre las manos y los brazos de los sujetos E.

Esto refuerza el resultado anterior, ya que explica la aparición de géneros bacterianos únicos en las manos de los sujetos E y concuerda con que la exposición a HCs es el principal impulsor en la variación, tanto en términos de diversidad como de composición.

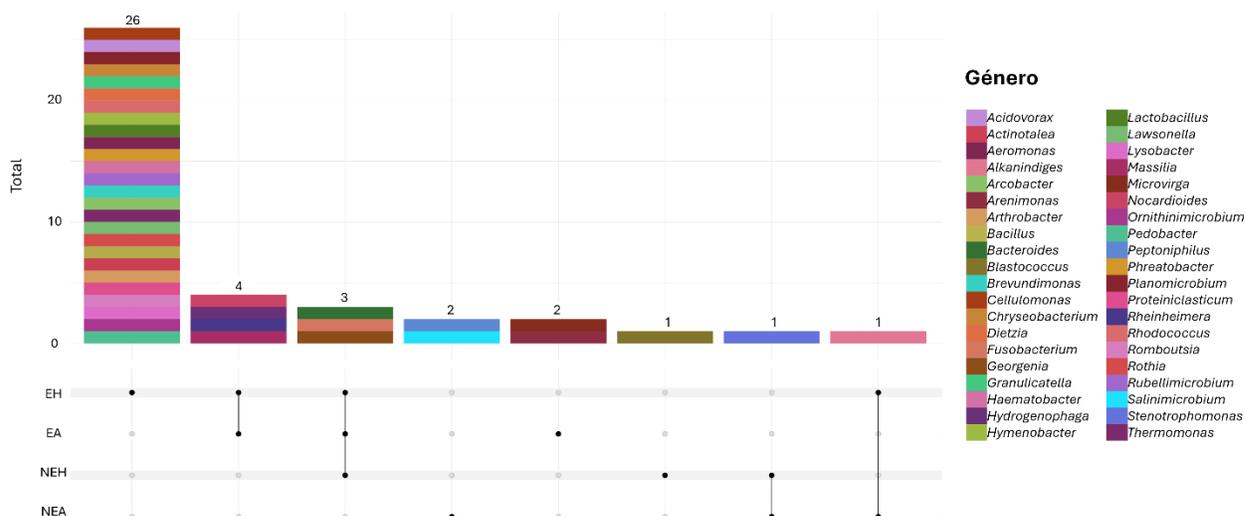


Figura 9. Upset que muestra la presencia de los géneros bacterianos únicos y compartidos por cada grupo. Se removieron los géneros que se compartían entre todos los grupos.

3.6 géneros bacterianos con diferencias significativas en su abundancia

A nivel de cohorte, se observaron diferencias significativas en la abundancia relativa de 18 géneros bacterianos entre los sujetos expuestos (E) y los sujetos de control (NE) (Tabla 4). Estos géneros incluyeron *Aeromonas*, *Alkanindiges*, *Arthrobacter*, *Defluviicoccus*, *Dietzia*, *Hydrogenophaga*, *Massilia*, *Microvirga*, *Nocardioides*, *Peptoniphilus*, *Pontibacter*, *Proteiniclasticum*, *Raoultella*, *Rheinheimera*, *Rubellimicrobium*, *Salinimicrobium*, *Subgroup 10* y *Thermomonas*.

Notablemente, solo *Peptoniphilus* y *Raoultella* se encontraron en mayor abundancia en el grupo NE comparado con en el grupo E; lo que podría indicar un efecto selectivo de los hidrocarburos sobre la microbiota cutánea.

Estos hallazgos sugieren que la exposición a hidrocarburos derivados del petróleo indujo un cambio distintivo en la composición de las comunidades bacterianas en la piel. Favoreciendo la prevalencia de ciertos taxones en el grupo expuesto.

Tabla 4. Resultados de la prueba de U de Mann-Whitney sobre la abundancia de géneros a nivel de cohorte.

género	Valor p
<i>Aeromonas</i>	0.00633
<i>Alkanindiges</i>	0.01493
<i>Arthrobacter</i>	0.03499
<i>Defluviicoccus</i>	0.03499
<i>Dietzia</i>	0.00157
<i>Hydrogenophaga</i>	0.03498
<i>Massilia</i>	0.01335
<i>Microvirga</i>	0.03499
<i>Nocardioides</i>	0.00633
<i>Peptoniphilus</i>	0.02977
<i>Pontibacter</i>	0.03498
<i>Proteiniclasticum</i>	0.01493
<i>Raoultella</i>	0.04507
<i>Rheinheimera</i>	0.02371
<i>Rubellimicrobium</i>	0.03498
<i>Salinimicrobium</i>	0.03498
<i>Subgroup 10</i>	0.03498
<i>Thermomonas</i>	0.03498

A nivel de subcohorte, las muestras EH mostraron cambios notables en la composición del microbioma. Por ello, analizamos qué géneros presentaban diferencias significativas ($p < 0.05$) en su abundancia media en comparación con el grupo de control NEH.

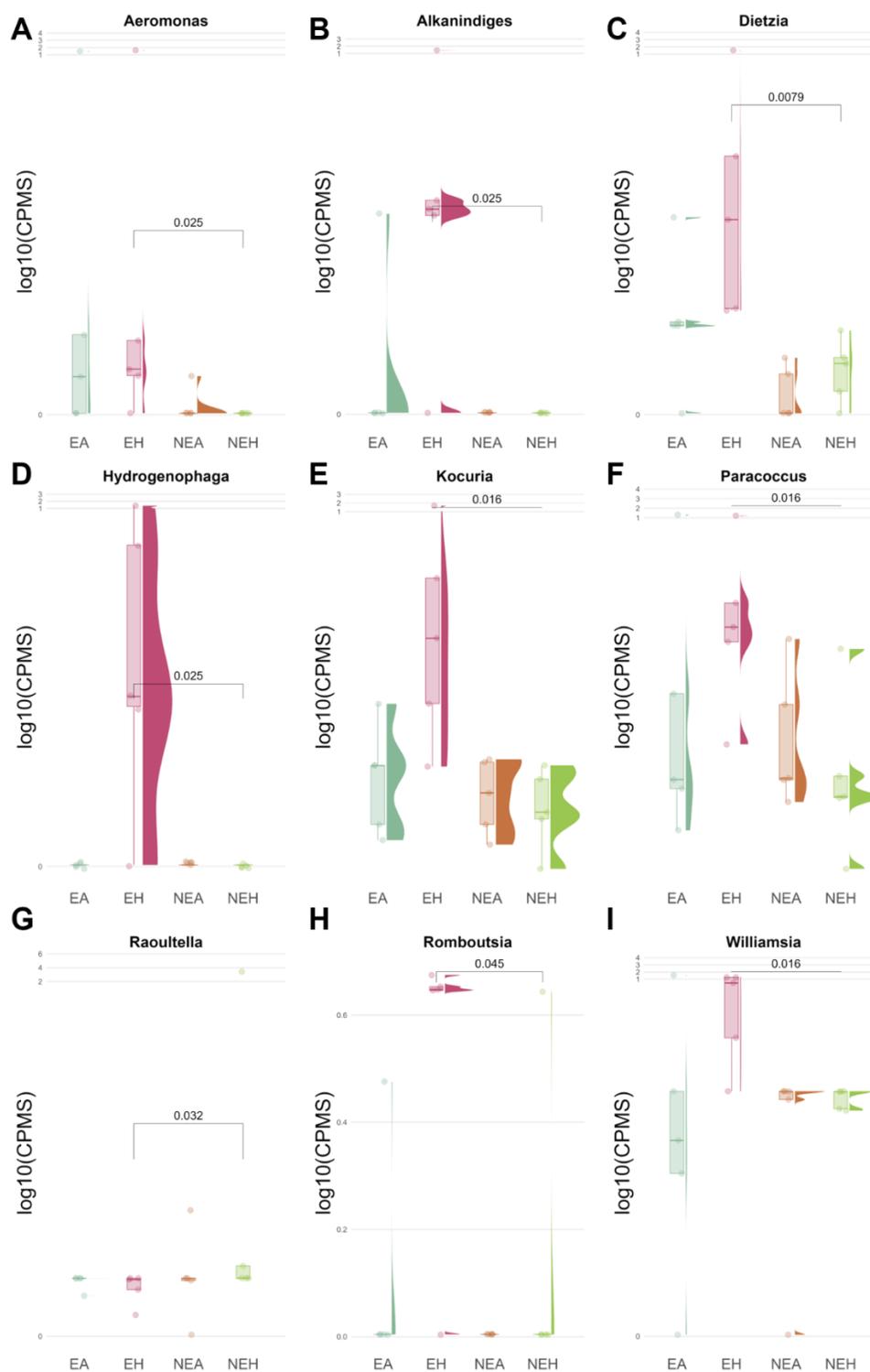


Figura 10. Bacterias con abundancias diferenciales (\log_{10} CPMS) entre grupos ($p < 0,05$, prueba de Mann–Whitney). Abreviaturas: EA; brazo expuesto, NEA; brazo no expuesto, EH; mano expuesta y NEH; mano no expuesta.

Nueve géneros presentaron diferencias significativas: *Alkanindiges*, *Aeromonas*, *Dietzia*, *Hydrogenophaga*, *Kocuria*, *Paracoccus*, *Raoultella*, *Romboutsia* y *Williamsia* (Figura 10 A-I). En la comparación intragrupo,

entre brazos, no hubo diferencias en abundancia para ningún género bacteriano. Este notable aumento solo para las muestras de mano puede ser debido a los mayores niveles de exposición y al contacto directo con fuentes de hidrocarburos que este sitio corporal sufre en su entorno laboral. En general, estos hallazgos sugieren que la exposición directa HCs derivados del petróleo es el factor determinante en la composición de la comunidad bacteriana en la superficie de la piel.

3.7 Predicción de las funciones metabólicas con PICRUST

Para comprender el potencial metabólico de las comunidades bacterianas, utilizamos la herramienta PICRUST con el fin de predecir las capacidades funcionales de los taxones identificados. A nivel de cohorte, la exploración inicial del potencial funcional a nivel 2 de la ortología KEGG (KO) reveló patrones de agrupamiento distintivos en las muestras de NE en comparación con las E, que mostraron una distribución más heterogénea. Esto sugiere que la exposición a hidrocarburos derivados del petróleo influye en las funciones metabólicas de las comunidades bacterianas (Figura 11A). De manera similar, a nivel de subcohorte, el grupo EH mostró una distribución heterogénea, lo que sugiere un potencial un metabolismo diferente en comparación con su contraparte, el grupo NEH (Figura 11B).

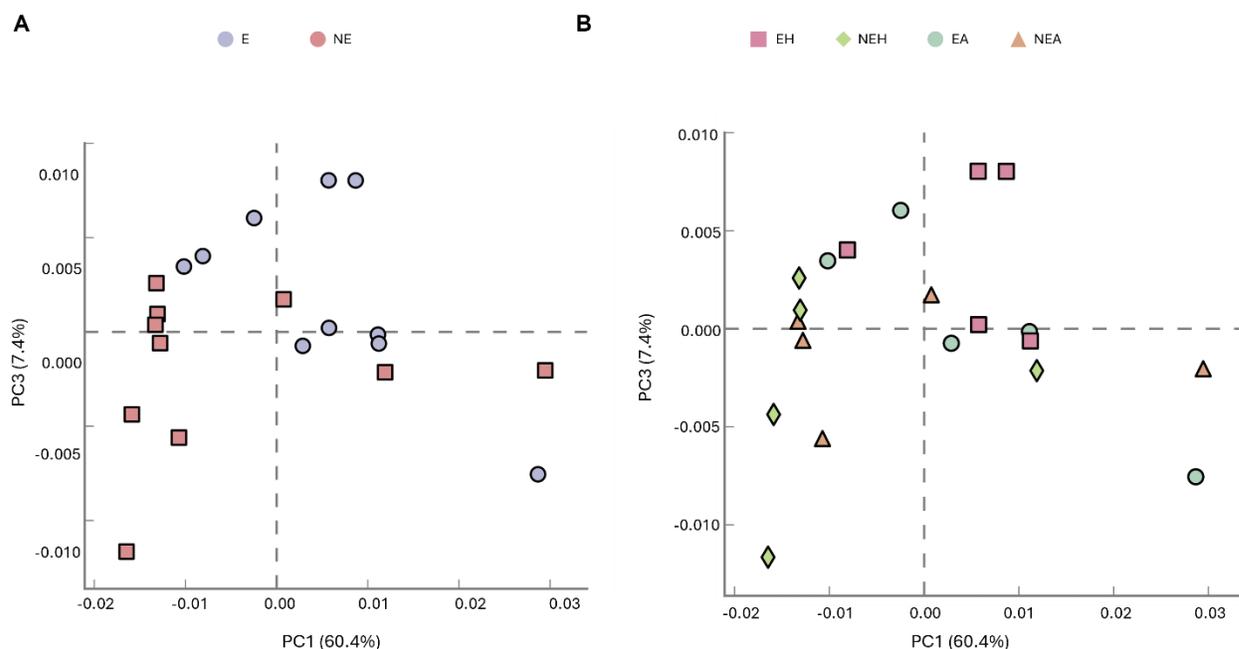


Figura 11. Gráfico de PCA obtenido del análisis con STAMP de perfiles funcionales proyectados por PICRUST (nivel 2, ortología KEGG) a niveles de cohorte (A) y subcohorte (B). La cohorte se divide en sujetos expuestos (E) y no expuestos (NE), mientras que la subcohorte se divide en brazo expuesto (EA), brazo no expuesto (NEA), mano expuesta (EH) y mano no expuesta (NEH).

Considerando que la mayoría de los cambios ocurren entre las muestras de EH y NEH, profundizamos en el análisis del potencial metabólico de estas comunidades bacterianas. Encontramos diferencias significativas en secuencias asociadas a 45 vías metabólicas entre EH y NEH (Figura 14), involucradas en funciones como la biosíntesis de lípidos y esteroides, la degradación y síntesis de proteínas, y la degradación de hidrocarburos; las manos expuestas mostraron una diferencia positiva en abundancias relativas, sugiriendo mayor actividad en estas vías respecto a sus contrapartes.

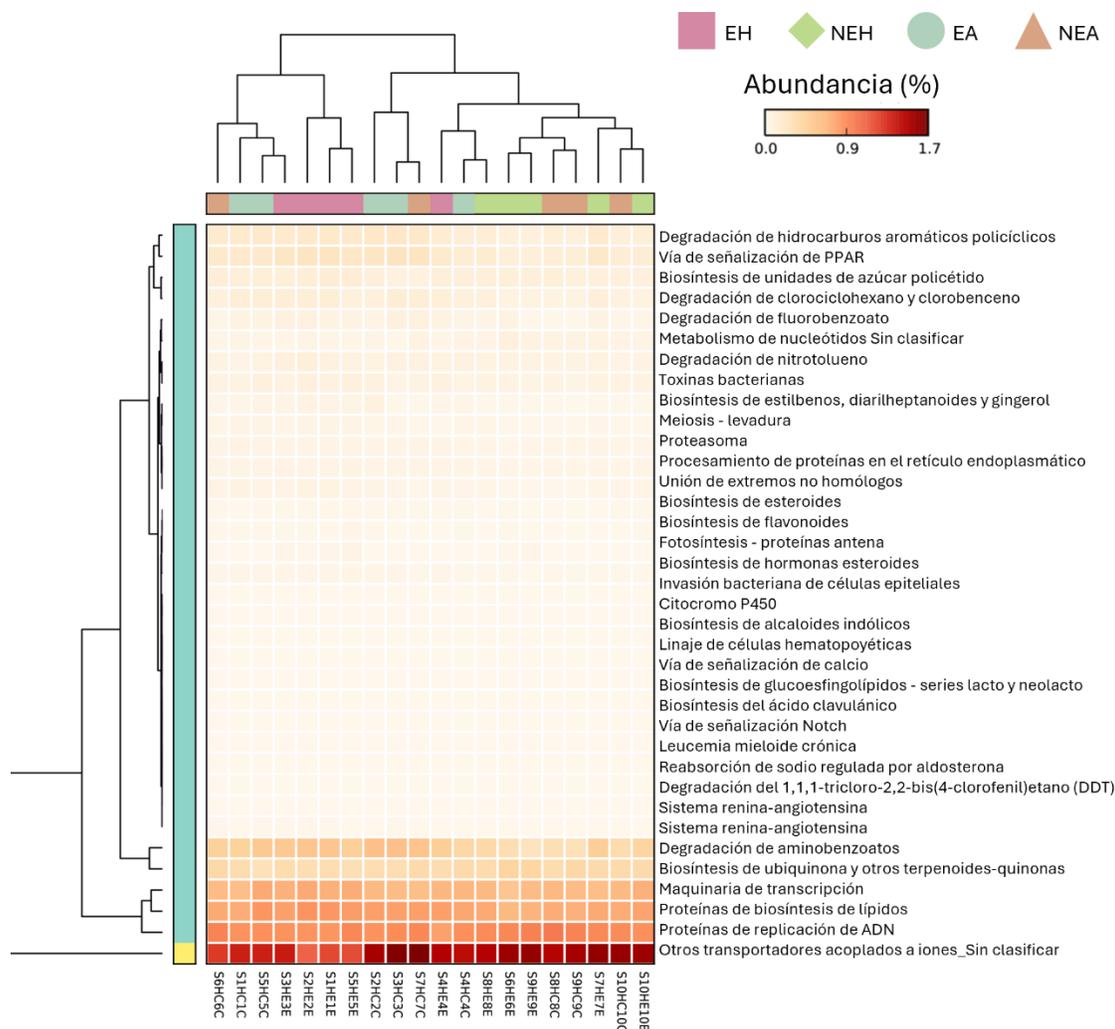


Figura 13. Mapa de calor de las predicciones según la abundancia relativa de KO anotada en el nivel 3 de KEGG a nivel de subcohorte. Donde, EA = Brazo expuesto, NEA = Brazo no expuesto, EH = Mano expuesta y NEH = Mano no expuesta. Las vías metabólicas mostradas son las que tienen un cambio en su expresión estadísticamente significativo ($p < 0.05$), entre las muestras mediante un ANOVA

En contraste, las muestras de EA y NEA mostraron diferencias mínimas, con solo seis vías metabólicas variando significativamente y ninguna relacionada con la degradación de hidrocarburos. Esto resalta el efecto distintivo de la exposición a hidrocarburos sobre el potencial metabólico de las comunidades bacterianas.

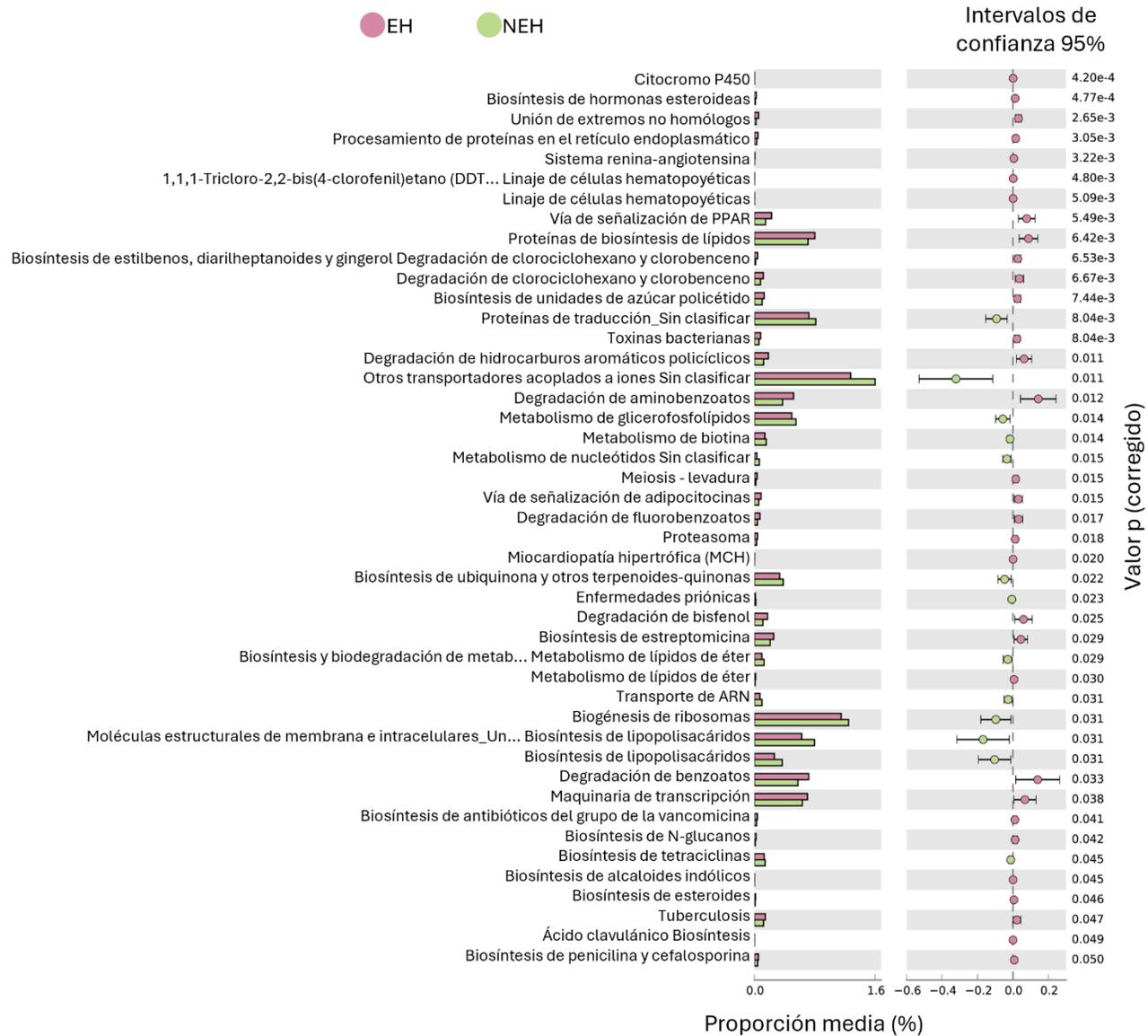


Figura 14. Gráfico de barras de error extendido que muestra los KO con cambios significativos a nivel global (nivel KEGG 3) entre las subcohortes EH y NEH. EH = Mano expuesta y NEH = Mano no expuesta.

Para determinar si la exposición a hidrocarburos (HC) también afectaba los brazos, seleccionamos solo las vías de degradación de estos compuestos que estuvieran significativamente impactadas en la comparación entre manos. Encontramos que las muestras EH tienen una mayor abundancia relativa de genes asociados a estas vías, sugiriendo una mayor actividad en comparación con sus contrapartes. En la comparación entre brazos, ninguna de estas vías estaba afectada.

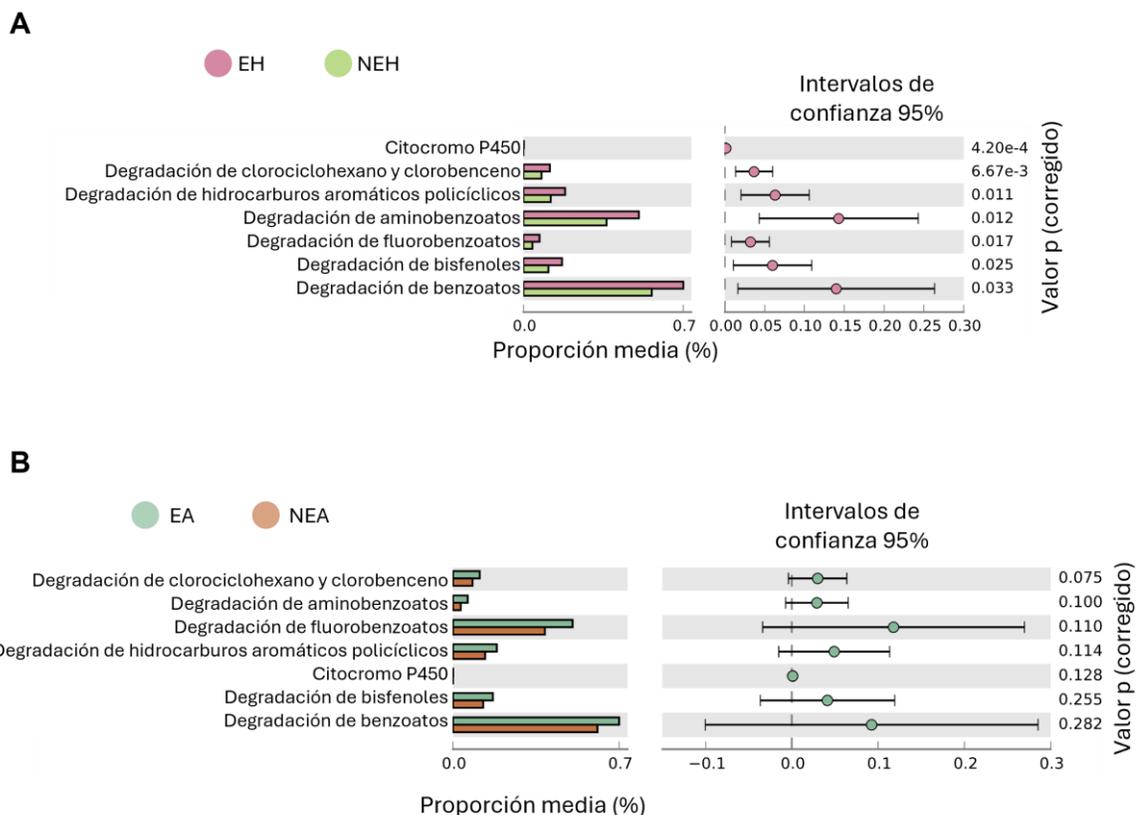


Figura 15. KO significativamente desregulados (nivel KEGG 3) asociados con el metabolismo de hidrocarburos entre las subcohortes EH y NEH (A) y EA y NEA (B).

3.8 Efecto de la exposición a derivados del petróleo sobre el metabolóma de la piel

En general, se detectaron 861 atributos utilizando la plataforma MZmine en todas las muestras de individuos expuestos y no expuestos. La matriz generada, que contenía los datos de abundancia para cada feature, se normalizó primero usando NormalyzerDE y luego se procesó en la página web de MetImp para un filtrado del 80% e imputación de datos faltantes por grupo, lo que resultó en una matriz de datos con 804 atributos (Anexos, Tabla 9). Posteriormente, la matriz de datos resultante se sometió a análisis en la página web de MetaboAnalyst.

Nuestro enfoque inicial implicó realizar un análisis de componentes principales (PCA) para examinar la influencia de los derivados del petróleo en la superficie de la piel. Los resultados de este análisis mostraron patrones de agrupamiento distintos entre muestras de individuos expuestos y no expuestos a hidrocarburos de petróleo (Figura 16A), evidenciando los efectos potenciales de los derivados del petróleo en la superficie de la piel. Tras una investigación más profunda a nivel de subcohorta (Figura 16B), observamos que las muestras de EH formaban grupos separados de las demás, proporcionando evidencia adicional del impacto de los derivados del petróleo en la superficie de la piel.

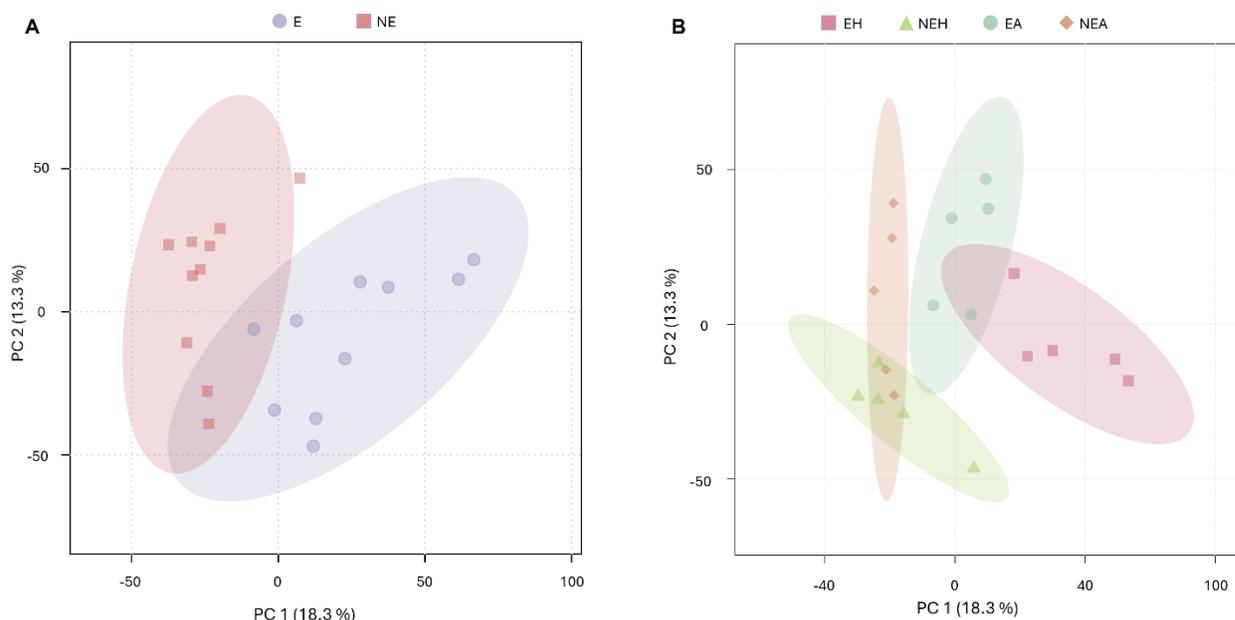


Figura 16. Análisis de componentes principales generado con MetaboAnalyst 4.0 de 804 atributos a nivel de cohorte (A) y subcohorta (B). Donde, E = Sujetos expuestos, NE = Sujetos no expuestos, EA = Brazo expuesto, NEA = Brazo no expuesto, EH = Mano expuesta y NEH = Mano no expuesta.

Posteriormente, con el fin de entender mejor los cambios producidos en el metaboloma, seleccionamos los 50 principales atributos con cambios significativos en su abundancia media mediante un análisis ANOVA. Luego, se realizó un análisis de clúster utilizando la distancia euclidiana y el algoritmo de Ward para generar un mapa de calor, proporcionando una visión más clara del comportamiento de las muestras y profundizando en las posibles diferencias en sus patrones de agrupación tanto a nivel de cohorte (Figura 17) como de subcohorta (Figura 18).

Esta representación visual evidenció consistentemente los cambios en los perfiles de metabolitos entre individuos expuestos a derivados del petróleo y aquellos no expuestos, particularmente en las manos, el área más susceptible a la exposición.

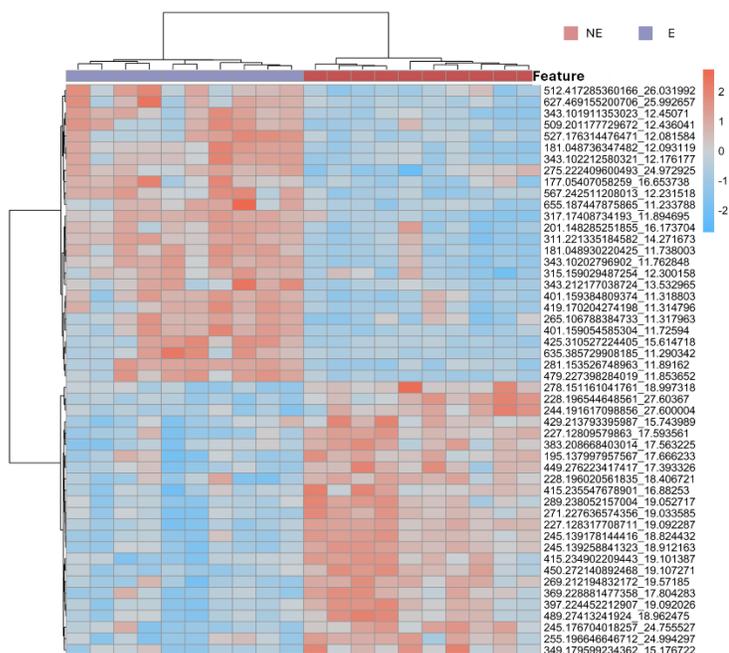


Figura 17. Mapa de calor de las 50 señales principales clasificadas por una prueba t que muestra su abundancia relativa escalada (z-score) a nivel de cohorte. Esta visualización permite distinguir los cambios en abundancia para cualquier molécula (filas) por muestra de cada sujeto (columnas). El número en la parte inferior del mapa de calor es el número de identificación de cada muestra. El color varía desde el rojo intenso (abundancia o nivel alto) hasta el azul profundo (abundancia o nivel bajo); el color blanco representa que no hubo cambio. Donde, E = Sujetos expuestos, NE = Sujetos no expuestos.



Figura 18. Mapa de calor de las 50 señales principales clasificadas por una ANOVA que muestra su abundancia relativa escalada (z-score) a nivel de cohorte. Esta visualización permite distinguir los cambios en abundancia para cualquier molécula (filas) por muestra de cada sujeto (columnas). El número en la parte inferior del mapa de calor es el número de identificación de cada muestra. El color varía desde el rojo intenso (abundancia o nivel alto) hasta el azul profundo (abundancia o nivel bajo); el color blanco representa que no hubo cambio. Donde, EA = Brazo expuesto, NEA = Brazo no expuesto, EH = Mano expuesta y NEH = Mano no expuesta

Continuando con la comparación entre los dos grupos de manos, construimos un diagrama de volcán para visualizar los atributos con cambios significativos en abundancia. Se observó que se alteraron un total de 229 atributos en manos de individuos expuestos en comparación con las de individuos no expuestos (Figura 19A), y solo se observaron 78 atributos alteradas en nuestra comparación de control intragrupal, las muestras de brazo (Figura 19B). Estos atributos alterados sugieren que la exposición crónica a hidrocarburos derivados del petróleo puede provocar cambios específicos en los perfiles del metaboloma de la superficie dérmica.

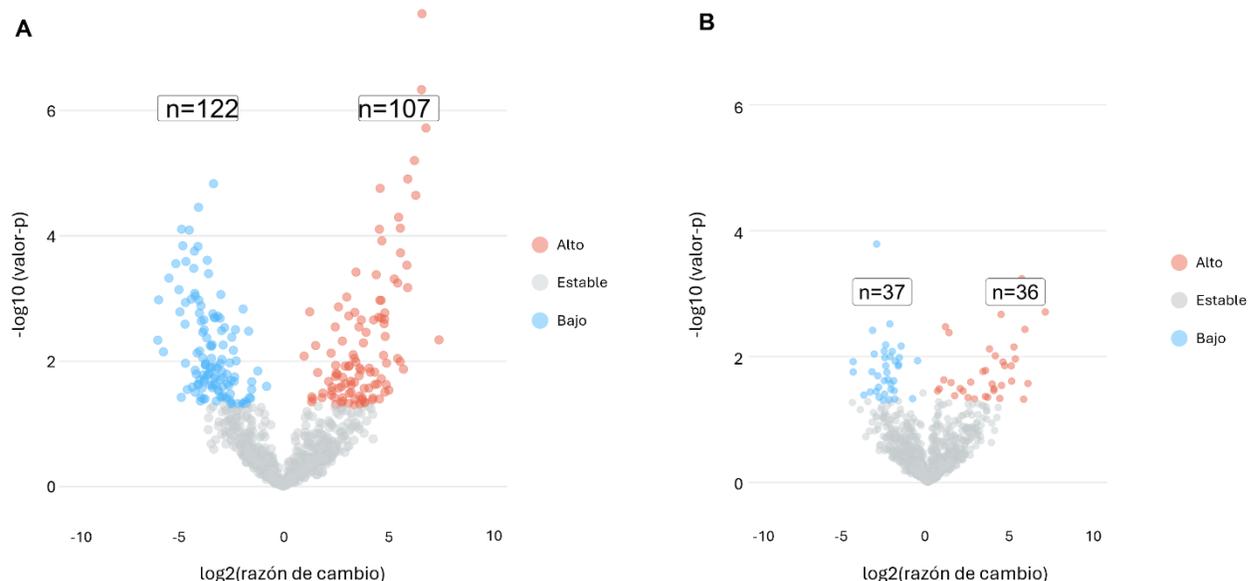


Figura 19. Gráfico de volcán generado partir de las diferencias en abundancia de las moléculas con un umbral de cambio de 2 (eje x) y un umbral de prueba t (eje y) de 0.05 analizados con varianzas desiguales entre las muestras de manos (A) y brazos (B) de sujetos expuestos y no expuestos a hidrocarburos. Los círculos rojos representan abundancias mayores, mientras que los azules, abundancias menores al umbral. Cuanto más lejos estén del cero más significativa es la diferencia.

3.9 Exploración el espacio químico para comprender el efecto de los hidrocarburos en la piel

Para explorar el espacio químico, construimos una red molecular utilizando los atributos alineadas con espectros MS/MS similares ($n = 403$). Esta red incorpora las anotaciones espectrales automáticas y se amplió con las predicciones *in-silico* de CSI-FingerID, MolDiscovery y DEREPLICATOR (Figura 20).

Posteriormente, se obtuvieron sus superclases químicas empleando Classifyre en todas las anotaciones adquiridas de la red molecular. Las cinco superclases anotadas más abundantes fueron lípidos y moléculas similares a lípidos ($n=94$), seguidas de ácidos orgánicos y derivados ($n=56$), compuestos orgánicos de

oxígeno (n=26), compuestos orgánicos de nitrógeno (n=23), bencenoides (n=22) y compuestos organoheterocíclicos (n=22).

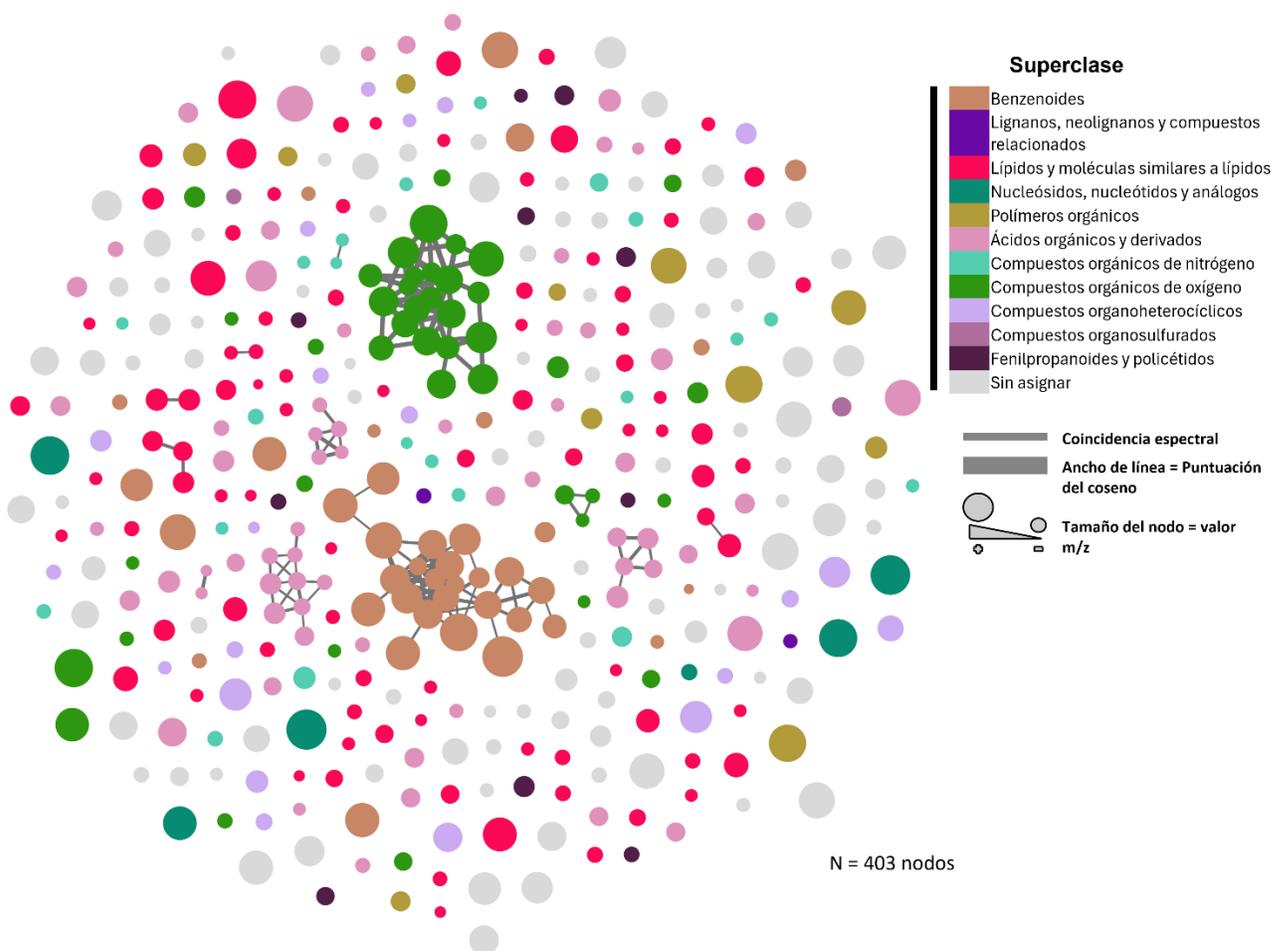


Figura 20. Red molecular de metabolitos detectados en todas las muestras que muestra la diversidad química. Cada nodo representa un ion precursor (MS1) y el grosor de los bordes entre los nodos indica similitud en los patrones de fragmentación de MS2. El tamaño del nodo indica el valor m/z. Se organizaron un total de 403 nodos espectrales de masas (en un rango de masas de 143,1063 a 1310,9960 m/z). El color del nodo denota la anotación estructural de la red molecular global a nivel de superclase utilizando NAP (clasificación ClassyFire). Para cada red con ≥ 2 nodos, NAP asignó una estructura candidata de consenso por nodo y, posteriormente, cada estructura se clasificó utilizando ClassyFire, donde se recuperaron las clasificaciones de consenso más frecuentes por red o clúster para asignar una anotación de superclase putativa a cada red o clúster. Los clústeres con nodos grises indican una superclase sin asignar.

A continuación, utilizamos la herramienta CANOPUS para predecir clases de compuestos directamente a partir de los datos MS/MS exportados desde la plataforma MZmine, con el objetivo de obtener una mejor comprensión del espacio químico e investigar los posibles efectos de la exposición a los hidrocarburos del petróleo en el metaboloma de la piel (Figura 21). Se predijeron 39 clases químicas utilizando la herramienta CANOPUS, lo que proporcionó más información sobre el origen de los compuestos y los tipos de sustancias químicas que pueden verse afectadas por la exposición a los hidrocarburos de petróleo.

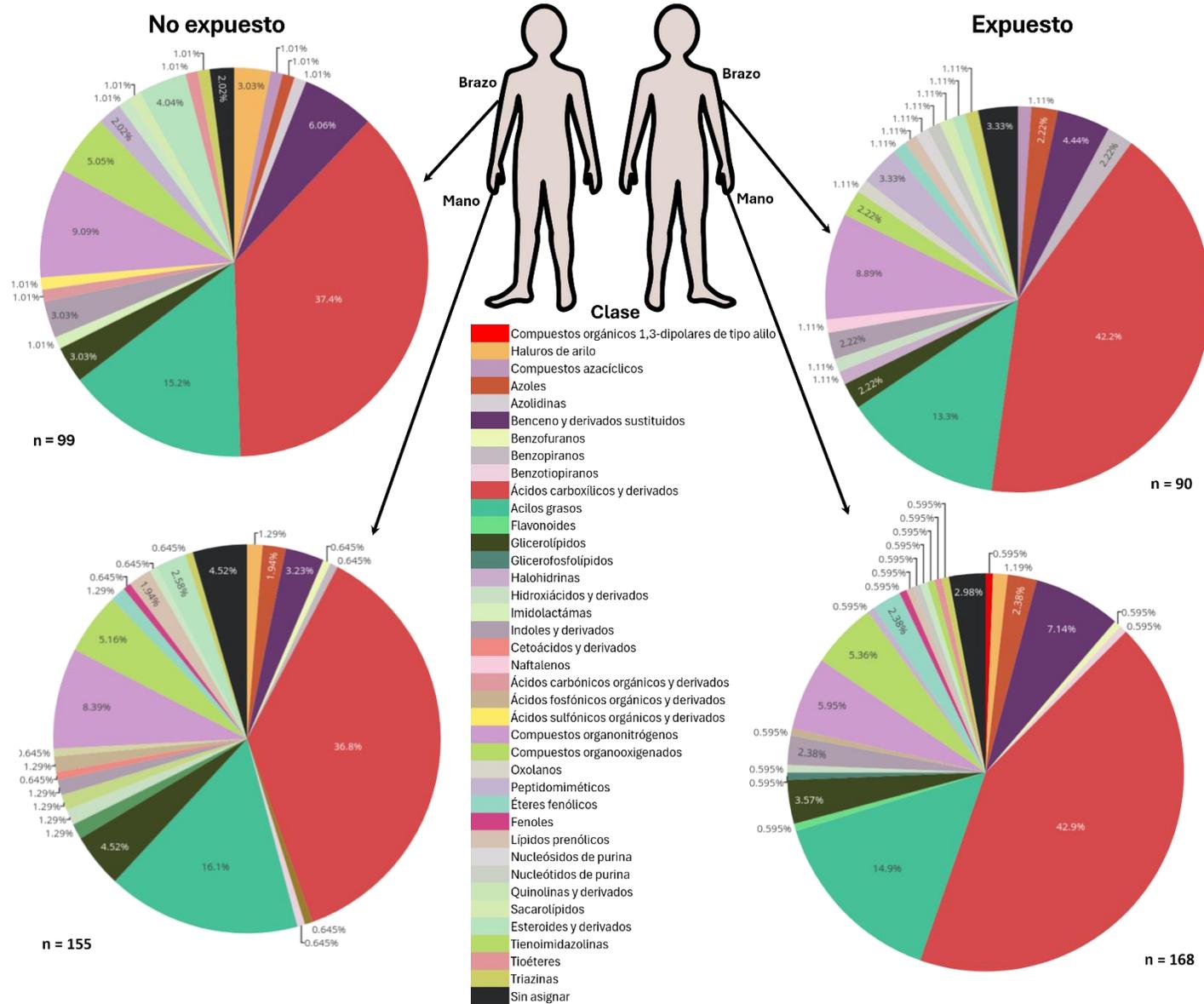


Figura 21. Diversidad química global identificada por grupo. Las clases químicas (basó en Classyfire) fueron identificadas y asignadas a los atributos detectadas que poseen un MS2 en todos los grupos.

Se encontró que los individuos no expuestos tenían 254 compuestos con clases químicas predichas, con 155 en sus manos y 99 en sus brazos. Por el contrario, los individuos expuestos mostraban un total de 258 compuestos con clases químicas predichas, con 168 en sus manos y 90 en sus brazos. Los compuestos identificados pertenecían a diversas clases químicas, como azoles, acilos grasos, glicerolípidos, naftalenos, compuestos organoxigenados y peptidomiméticos, entre otros.

3.10 Diferencias en abundancia de las clases químicas

A fin de profundizar en el análisis del espacio químico y conocer qué grupos de metabolitos (por clase química) se encontraban alterados, se realizó un análisis estadístico para identificar clases de compuestos con cambios significativos en su abundancia, tanto a nivel de cohorte como de subcohorte.

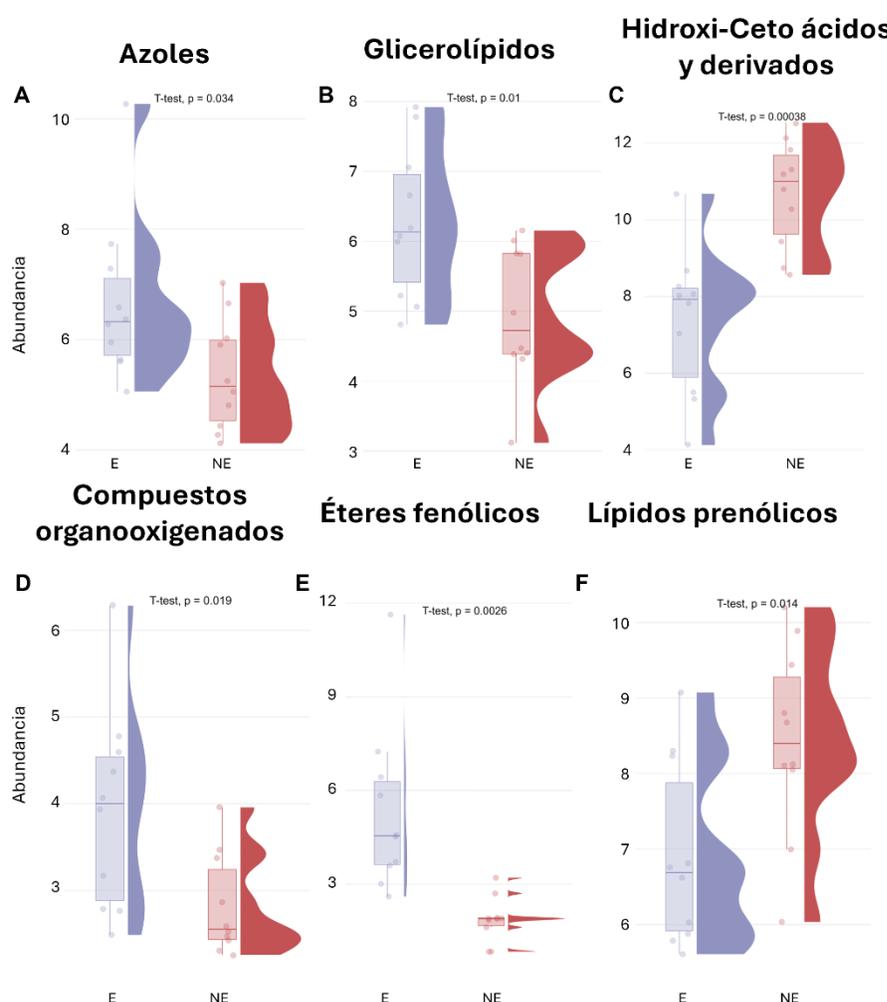


Figura 22. Clases químicas afectadas significativamente (valor $p < 0.05$, prueba t) a nivel de cohorte. Se graficó la abundancia sumada (Log2) de todos los metabolitos asignados a cada clase química. Donde, E = Sujetos expuestos y NE = Sujetos no expuestos.

A nivel de cohorte, el análisis reveló alteraciones en la abundancia de siete clases: azoles, glicerolípidos, hidroxi-ceto ácidos y derivados, compuestos organooxigenados, éteres fenólicos y lípidos prenólicos (Figura 22).

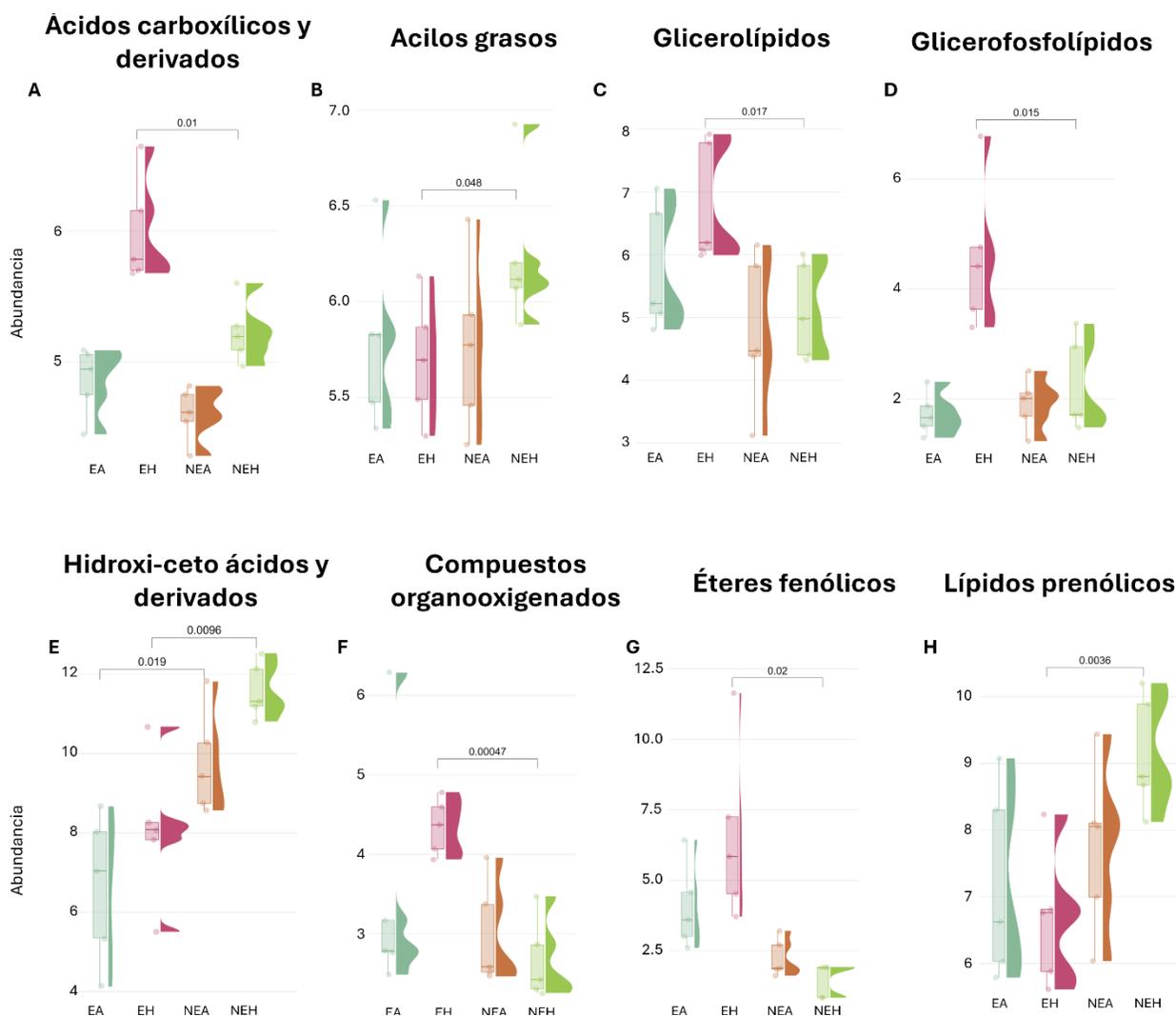


Figura 23. Las clases químicas desregulan significativamente (valor $p < 0.05$, prueba t) a nivel de subcohorte. Se graficó la abundancia sumada (Log2) de todos los metabolitos asignados a cada clase química. Donde, EA = Brazo expuesto, NEA = Brazo no expuesto, EH = Mano expuesta y NEH = Mano no expuesta.

A nivel de subcohorte (Figura 23), la comparación de manos (EH vs NEH) mostró diferencias en ocho clases químicas: ácidos carboxílicos y derivados, acilos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, hidroxi-ceto ácidos y derivados, compuestos organooxigenados, éteres fenólicos y lípidos prenólicos. Es importante señalar que las manos son la parte del cuerpo con mayor exposición a hidrocarburos del petróleo en nuestro grupo experimental y, consistentemente con los resultados anteriores, es la zona donde se producen los mayores cambios en abundancia. Es importante señalar que para la comparación entre los brazos de individuos expuestos y no expuestos, solo una clase de compuestos mostró diferencias

significativas en abundancia: hidroxí-ceto ácidos y derivados (Figura 23E). Esta se encontraba disminuida en los brazos de los sujetos expuestos HCs.

3.11 Metabolitos identificados con cambios en su abundancia

Para identificar con precisión los metabolitos específicos que contribuyen a las diferencias observadas en las clases químicas, se utilizó GNPS para la anotación automática y el empleo de herramientas de anotación *in silico* como: SIRIUS, MolDiscovery y DEREPLICATOR. Estas herramientas nos permitieron identificar o anotar un total de 238 metabolitos únicos en todos los sitios anatómicos (Anexos, Tabla 10). Después de unir esto con el conjunto de 229 metabolitos alterados de manera significativa en la comparación de manos, identificamos con éxito 57 metabolitos responsables de estas disparidades, con una distribución aproximadamente igual de 33 metabolitos regulados positivamente y 24 regulados negativamente (Anexos, Tabla 11). De manera similar, nuestro análisis detallado reveló 15 metabolitos cruciales que contribuyeron a las variaciones observadas en la comparación de brazos, distribuidos entre diez compuestos regulados al alza y cinco compuestos regulados a la baja (Anexos, Tabla 12).

3.12 Descripción general de las interacciones metaboloma-microbioma y los efectos de los derivados del petróleo en la superficie de la piel

Para investigar la presencia de sintropía interómica, realizamos un análisis de Procrustes y un análisis de Coinercia, a ambos niveles, utilizando M2IA. A nivel de cohorte, el análisis de Procrustes mostró similitudes moderadas entre los conjuntos de datos del metaboloma y del microbioma, aunque sin significación estadística (Figura 24A; $R = 0.35$, $p = 0.18$). En contraste, el análisis de coinercia mostró una mayor similitud general entre los dos conjuntos de datos (Figura 24B; $RV = 0.46$).

Al comparar las manos de individuos expuestos y no expuestos (subcohorte), el análisis de Procrustes reveló un bajo grado de similitud y careció de significación estadística (Figura 25A; $R = 0.5$, $p = 0.19$). Mientras que para la comparación entre las muestras EH y NEH, el análisis de coinercia reveló un mayor nivel de similitud en ambos conjuntos de datos (Figura 25B; $RV = 0.66$). Es relevante mencionar que el análisis utilizando la plataforma M2IA no mostró resultados significativos en la comparación entre brazos, lo que evidenció el efecto significativos de los HCs en las manos.

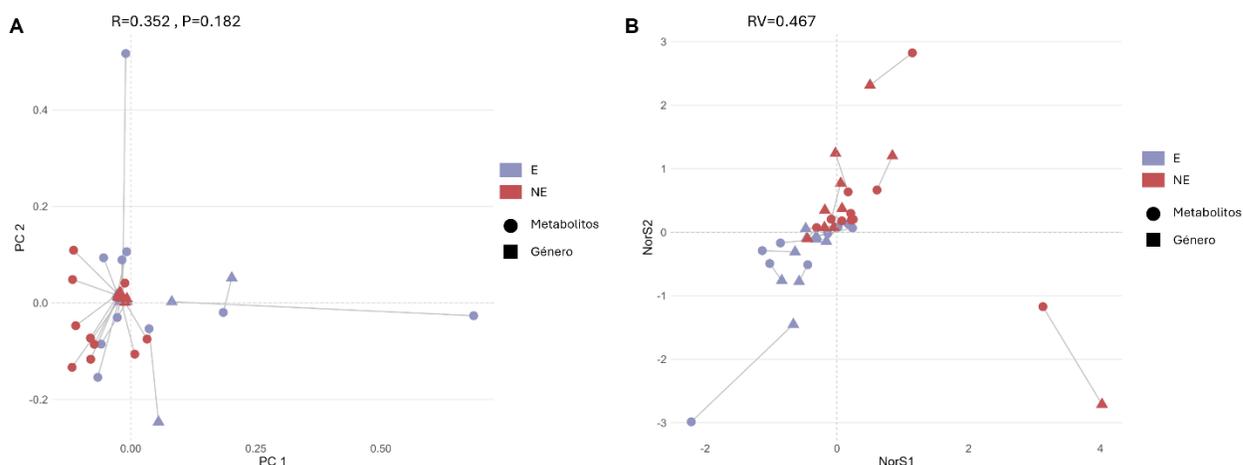


Figura 24. Análisis interómico de Procrustes (A) y coinerencia (B) a nivel de cohorte. Cada punto de datos representa una muestra individual y tiene diferentes formas (metaboloma, punto; microbioma, cuadrado). Las líneas representan la distancia o la similitud entre el microbioma y el metaboloma. Las líneas más largas indican más disimilitud. Los valores del coeficiente R y P se calcularon utilizando el análisis de correlación de Spearman. En Procrustes, el coeficiente de correlación R es entre 0 y 1, y cuanto más cerca está 1 indica la mayor similitud entre dos conjuntos de datos. El valor de $P < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. Para la coinerencia, el coeficiente de RV es el coeficiente de correlación entre los dos conjuntos de datos y varía entre 0 y 1. Cuanto más cerca esté 1 indica la mayor similitud entre dos conjuntos de datos. Donde, E = Sujetos expuestos y NE = Sujetos no expuestos.

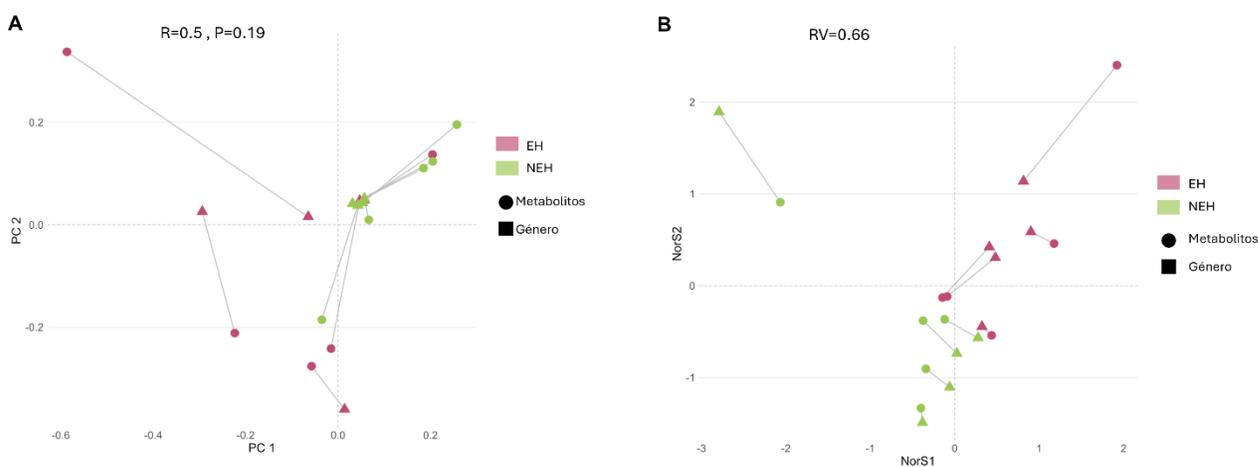


Figura 25. Análisis interómico de Procrustes (A) y coinerencia (B) a nivel de subcohorte. Cada punto de datos representa una muestra individual y tiene diferentes formas (metaboloma, punto; microbioma, cuadrado). Las líneas representan la distancia o la similitud entre el microbioma y el metaboloma. Las líneas más largas indican más disimilitud. Los valores del coeficiente R y P se calcularon utilizando el análisis de correlación de Spearman. En Procrustes, el coeficiente de correlación R es entre 0 y 1, y cuanto más cerca está 1 indica la mayor similitud entre dos conjuntos de datos. El valor de $P < 0.05$ se considera estadísticamente significativo. Para la coinerencia, el coeficiente de RV es el coeficiente de correlación entre los dos conjuntos de datos y varía entre 0 y 1. Cuanto más cerca esté 1 indica la mayor similitud entre dos conjuntos de datos. Donde, EA = Brazo expuesto, NEA = Brazo no expuesto, EH = Mano expuesta y NEH = Mano no expuesta.

Los resultados de las métricas de Procrustes como las de coinerencia sugieren que la exposición a derivados de hidrocarburos del petróleo altera las relaciones interómicas existentes en la superficie de la piel.

3.13 Asociación entre la microbiota cutánea y los metabolitos

Para comprender la asociación entre bacterias y metabolitos específicos, utilizamos un análisis de correlación de Spearman, este análisis resaltó correlaciones significativas entre las bacterias y los metabolitos tanto a nivel de cohorte (Figuras 26 y 28) como de subcohorte (Figuras 27 y 29).

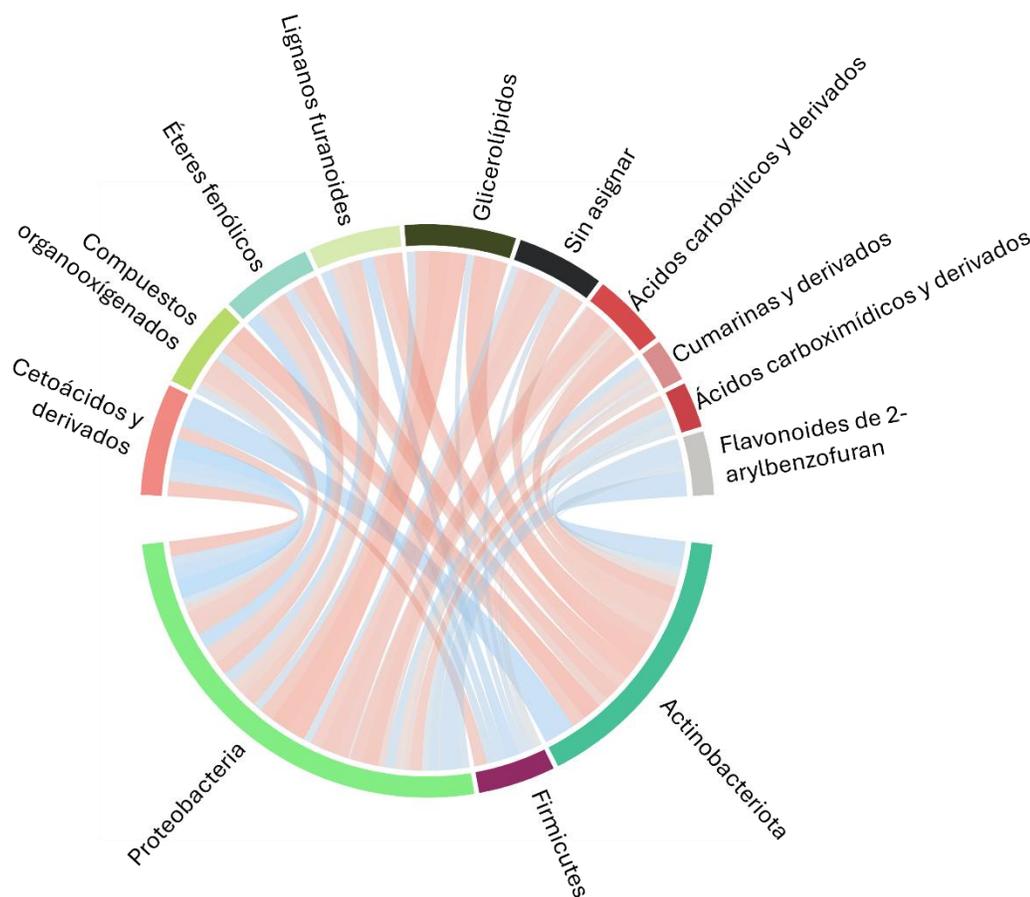


Figura 26. Diagrama de cuerdas que muestra el análisis de asociación a nivel de cohorte basado en el análisis de correlación de Spearman. Las líneas rojas y azules especifican correlaciones positivas y negativas, respectivamente.

El diagrama de cuerdas ilustra la correlación entre filamentos bacterianos y clases de metabolitos. Las líneas rojas indican correlaciones positivas y las líneas azules, correlaciones negativas. El grosor de las líneas refleja la fuerza de la correlación.

A nivel de cohorte, el diagrama de cuerdas reveló que los géneros bacterianos de los filamentos Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria estaban estrechamente correlacionados con 10 clases de metabolitos, incluidos cetoácidos y derivados, ésteres fenólicos, lignanos furanoídes, glicerolípidos, compuestos organooxigenados, entre otros (Figura 26).

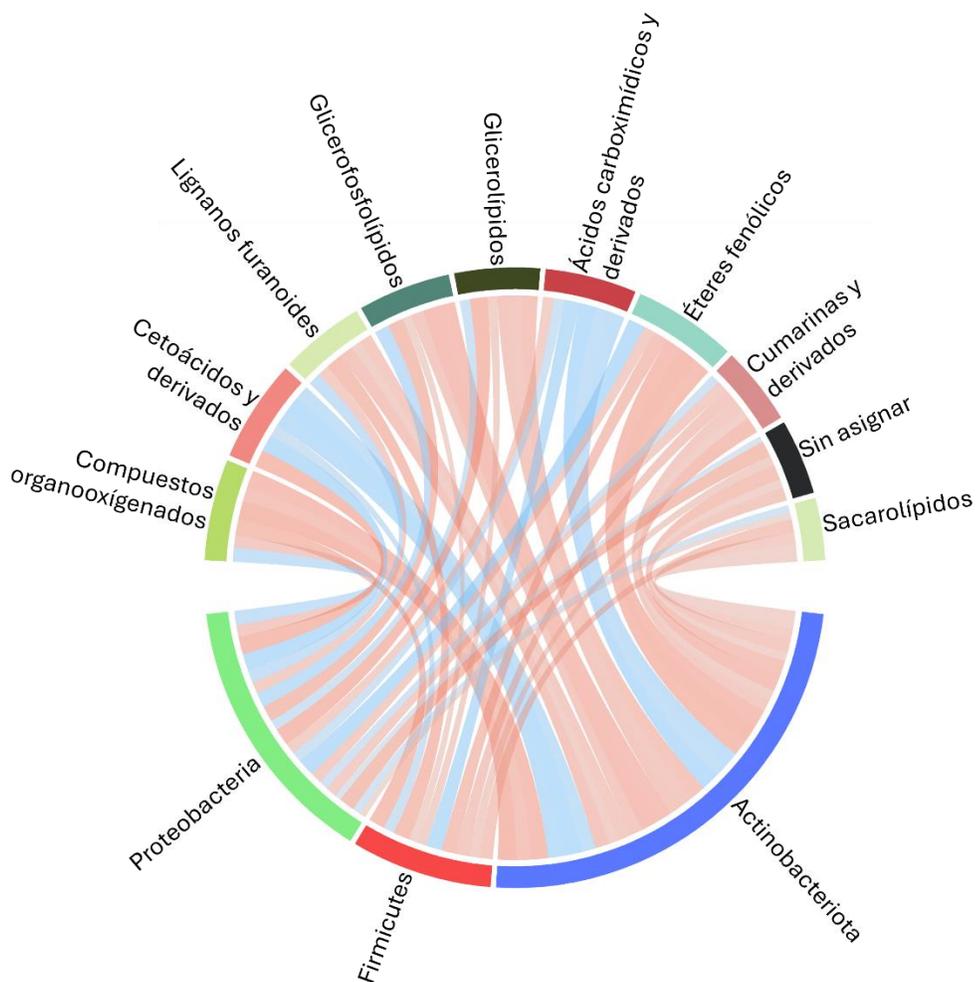


Figura 27. Diagrama de cuerdas de la comparación entre manos que muestra la asociación basada en el análisis de correlación de Spearman. En el diagrama de cuerdas, las líneas rojas y azules especifican correlaciones positivas y negativas, respectivamente.

A nivel de subcohorte, solo la comparación entre EH y NEH mostró asociaciones específicas entre géneros bacterianos y metabolitos. El gráfico de cuerdas reveló correlaciones positivas entre el filo Actinobacteriota y clases de metabolitos como éteres fenólicos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos y compuestos organoxigenados (Figura 27).

De manera similar, el filo Firmicutes mostró correlaciones positivas con lignanos furanoídes, cumarinas y derivados, glicerolípidos, glicerofosfolípidos y sacarolípidos. Por el contrario, se observaron correlaciones negativas entre ácidos carboximídicos y derivados, cetoácidos y derivados, y el filo Proteobacteria. Además, Actinobacteria también demostró correlaciones negativas con ácidos carboximídicos y derivados, y cetoácidos y derivados. Lo que evidencia la compleja interacción que ocurre en la superficie cutánea.

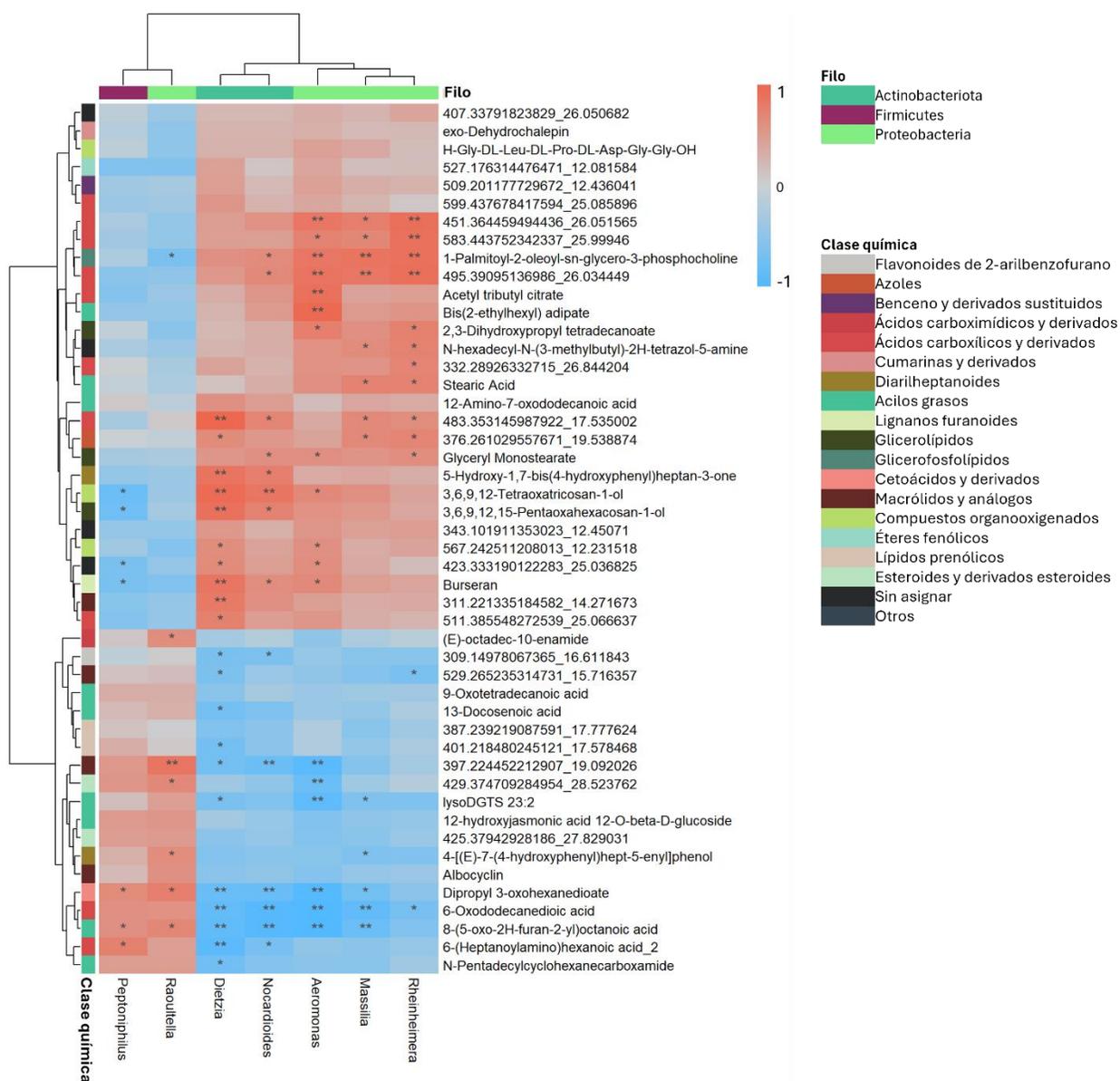


Figura 28. Mapa de calor que muestra el análisis de asociación a nivel de cohorte basado en el análisis de correlación de Spearman. Los mapas de calor expanden los resultados que se muestran en los diagramas de cuerdas. La correlación de Spearman, R , varía entre -1 a 1. $p < 0.05$ indica una correlación estadísticamente significativa. El color rojo y el color azul indican correlaciones positivas y negativas respectivamente. El símbolo * y ** indican el valor de P para los coeficientes de correlación menores que 0.05 o 0.01, respectivamente.

Para profundizar en los resultados anteriores, se realizaron mapas de calor. Este tipo de gráficos amplían los resultados anteriores, proporcionando una visión detallada de las correlaciones específicas entre géneros bacterianos y metabolitos.

En la comparación entre sujetos, géneros como *Dietzia*, *Nocardioidea*, *Rheinheimera* y *Aeromonas* se correlacionaron negativamente con los cetoácidos ácido 6-oxododecanodioico y éster dipropílico del ácido

3-oxohexanodioico. Por otro lado, *Dietzia*, *Nocardioides* y *Aeromonas*, se correlacionaron positivamente con el compuesto organooxygenado 3,6,9,12-tetraoxatricosan-1-ol (Figura 28). Estas correlaciones sugieren que ciertas bacterias pueden influir en la producción o el metabolismo de metabolitos específicos en la piel.

Mientras que el mapa de calor para la comparación EH contra NEH respalda los hallazgos del gráfico de cuerdas, mostrando correlaciones específicas entre géneros bacterianos y varios metabolitos (Figura 29).

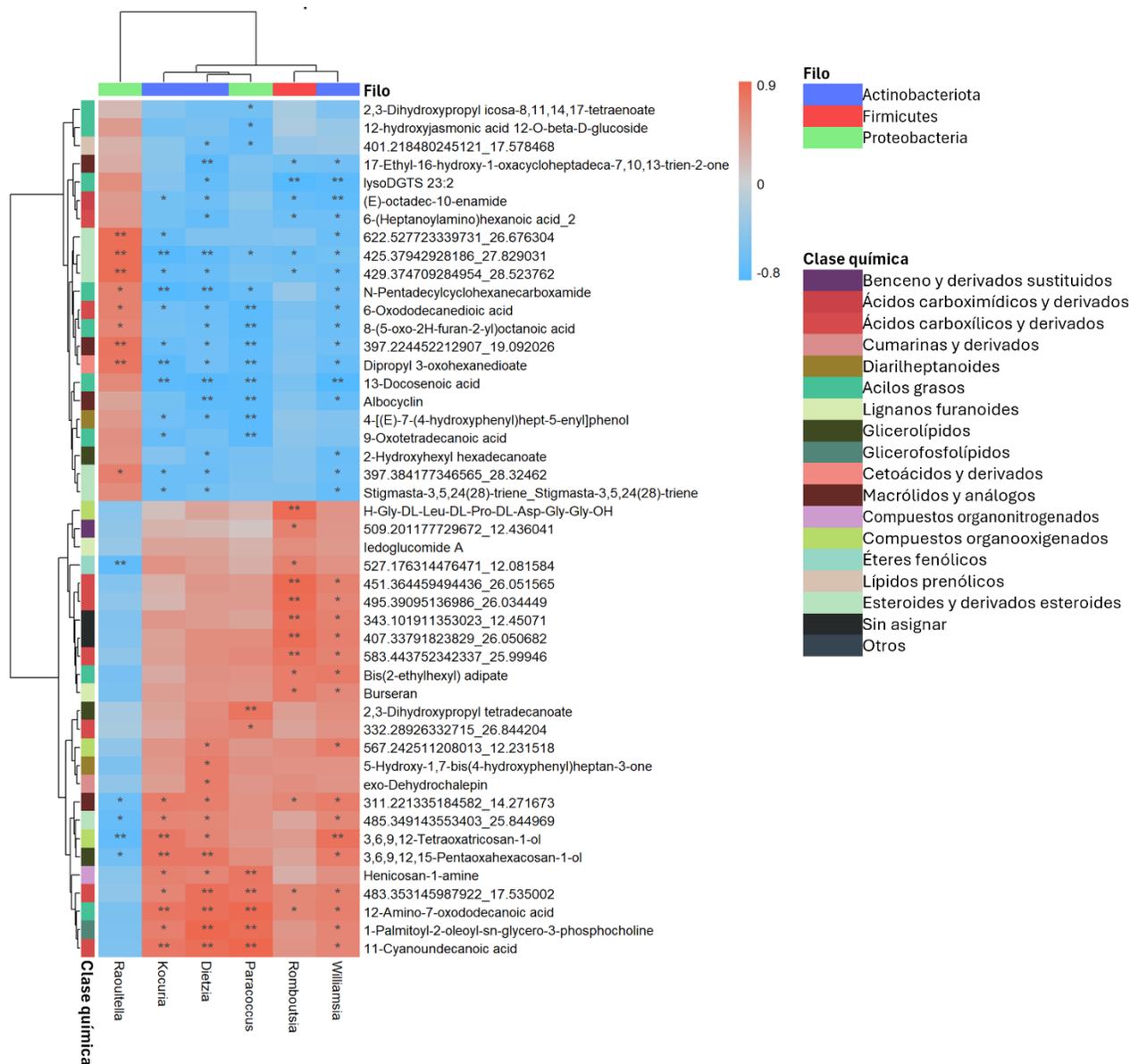


Figura 29. Mapa de calor para comparación entre manos que muestra la asociación basada en el análisis de correlación de Spearman. Los mapas de calor expanden los resultados que se muestran en los diagramas de cuerdas. La correlación de Spearman, R , varía entre -1 a 1. $p < 0.05$ indica una correlación estadísticamente significativa. El color rojo y el color azul indican correlaciones positivas y negativas respectivamente. El símbolo * y ** indican el valor de P para los coeficientes de correlación menores que 0.05 o 0.01, respectivamente.

Específicamente, *Dietzia*, *Kocuria*, *Paracoccus* y *Williamsia* se correlacionaron negativamente con acilos grasos, N-pentadecilciclohexanocarboxamida y ácido 13-docosenoico. Mientras tanto, estos géneros se correlacionaron positivamente con los ácidos carboxílicos, ácido 11-cianoundecanoico y (2R)-2-[[[(2R)-2-[(2,2-dimetil-1-oxopropil)amino]-1-oxopropil]amino]-4-metil-N-[(2R)-1-[[[(4R)-2-metil-5-oxoheptan-4-il]amino]-1-oxopropan-2-il]pentanamida. En general, estos resultados demuestran la intrincada relación entre géneros microbianos y metabolitos en la piel.

Capítulo 4. Discusión

La extensa utilización de los HCs derivados del petróleo en diversos entornos industriales, como talleres de reparación de automóviles y tiendas de neumáticos, ha suscitado un profundo escrutinio científico debido a su ubicuidad y las posibles implicaciones para la salud humana. Recientemente, se ha incrementado la atención en la interacción entre los microbios y la salud de la piel (Ashrafi et al., 2020; Cogen et al., 2008; van Rensburg et al., 2015), en particular debido a su estrecha relación con los contaminantes ambientales, lo que subraya la necesidad de investigar la influencia de los HCs en la superficie cutánea y su potencial contribución a trastornos dermatológicos. La microbiota de la piel, un ecosistema dinámico, desempeña un papel crucial en el bienestar cutáneo al interactuar con el entorno externo. Por tanto, es imperativo desentrañar cómo los HCs pueden perturbar la composición y función, tanto de las moléculas, así como de la microbiota de la piel, lo que a su vez afecta la salud general de la piel.

Este estudio cobra especial relevancia al centrarse en trabajadores expuestos crónicamente a HCS en su entorno laboral. Utilizando técnicas avanzadas como el metabarcoding y la metabolómica, nuestro objetivo fue dilucidar la intrincada interacción entre los HCs, las células y la microbiota de la piel, lo que no solo contribuye a una comprensión más completa de los efectos de estos compuestos en la salud cutánea, sino que también aporta ideas que pueden orientar medidas preventivas e intervenciones para individuos expuestos a riesgos ocupacionales similares.

Además, este estudio demuestra que la exposición a los HCs provoca cambios significativos tanto en la composición molecular como en la diversidad microbiana de la piel.

4.1 Diversificación y enriquecimiento de las comunidades bacterianas que habitan la piel

En los análisis ecológicos a partir de genes marcadores, métricas como la alfa diversidad facilitan la comprensión de su estructura en términos de riqueza (número de taxones), uniformidad (distribución) o ambas; constituyendo el primer paso para evaluar las diferencias entre distintos entornos (Willis, 2019).

La riqueza de especies se define como “el número de especies en una comunidad, ecosistema o región”

(Levin et al., 2009). Se observó que las muestras de individuos expuestos a hidrocarburos (HCs) presentan índices de diversidad alfa significativamente más altos en comparación con las muestras no expuestas (NE). Este patrón es particularmente evidente a nivel de subcohorte, donde la comparación entre las manos (EH vs. NEH) mostró diferencias significativas en la diversidad alfa. Es importante recordar que las manos son el sitio corporal con mayor exposición debido a la falta de medidas de protección. Por lo tanto, el aumento en la riqueza de especies en la mayoría de las muestras de sujetos expuestos probablemente se debe a la aparición de nuevos géneros bacterianos capaces de metabolizar HCs. Esto concuerda con reportes previos que indican que la exposición a HCs produce una diversificación en la microbiota de la piel (Leung et al., 2020).

Además, se encontraron resultados similares en las comparaciones de diversidad beta, donde las muestras E se agrupan de manera distinta a las NE, indicando la presencia de comunidades microbianas diferentes. Estos hallazgos coinciden con investigaciones anteriores que sugieren que la exposición a este tipo de compuestos puede resultar tanto en una mayor diversidad microbiana como producir cambios en la composición de la comunidad (Leung et al., 2020; Moreno-Ulloa et al., 2020).

Estos resultados revelan que la exposición a hidrocarburos moldea la composición de las comunidades bacterianas en la piel, manifestándose principalmente en las manos debido a la falta de protección adecuada. Aunque el brazo no entra en contacto directo con los hidrocarburos, también se observa una diversificación en la composición taxonómica en estas muestras en comparación con las muestras de control. Esto sugiere que los hidrocarburos pueden modular la organización taxonómica en toda la extremidad, incluso de manera indirecta, como el roce con sustancias o emanaciones. En resumen, los hidrocarburos parecen ser el factor determinante en la modulación de la biodiversidad de las comunidades microbianas en la piel, superando la influencia del sitio corporal.

4.2 géneros bacterianos que cambian su abundancia de manera significativa

A nivel de cohorte, se observaron cambios significativos en la abundancia de 18 géneros bacterianos. De estos, 16 aumentaron su abundancia relativa en las muestras E en comparación con las NE, mientras que solo dos lo hicieron en las muestras NE en comparación con las E. Los 16 géneros bacterianos enriquecidos en las muestras de los individuos E fueron *Aeromonas*, *Alkanindiges*, *Arthrobacter*, *Defluviicoccus*, *Dietzia*, *Hydrogenophaga*, *Massilia*, *Microvirga*, *Nocardioides*, *Peptoniphilus*, *Pontibacter*, *Proteiniclasticum*, *Raoultella*, *Rheinheimeria*, *Rubellimicrobium*, *Salinimicrobium*, *Subgroup 10* y *Thermomonas*. Por otro lado,

los géneros *Peptoniphilus* y *Raoultella* fueron los únicos cuya abundancia disminuyó en las muestras de los sujetos E en comparación con las NE.

Alkanindiges es un género de bacterias aerobias Gram positivas recientemente identificado y conocido por su capacidad de degradar HCs (Bogan et al., 2003; Klein et al., 2007; Ron & Rosenberg, 2010). Se encuentra comúnmente en ambientes contaminados con HCs, como arena contaminada con petróleo o suelos de campos petrolíferos (Bogan et al., 2003; Klein et al., 2007; Yadav et al., 2021). Estas bacterias son altamente dependientes de la presencia de HCs para su crecimiento y supervivencia (Ron & Rosenberg, 2010). El hecho de que *Alkanindiges* se encuentre en la microbiota cutánea de individuos expuestos a HCs sugiere que estas bacterias podrían verse beneficiadas por su presencia y contribuir al metabolismo y descomposición de estos compuestos en la piel.

Arthrobacter, un género de bacterias Gram positivas, también se encontró significativamente más abundante en las muestras E. Este género, es conocido por su capacidad de degradar agroquímicos y contaminantes, como los derivados del petróleo (Ali et al., 2022; Y. Gao et al., 2022; Gobbetti & Rizzello, 2014; Rosenberg et al., 1979). La presencia de *Arthrobacter* en la superficie de la piel, sugiere que la exposición a HCs puede favorecer su colonización y crecimiento, lo que podría potencialmente ayudar en la degradación y metabolismo de estos compuestos en la piel.

Defluviicoccus fue otro género bacteriano notablemente abundante en las muestras de los individuos E respecto a sus controles. *Defluviicoccus*, es un género de bacterias Gram negativas también recientemente identificado. Comúnmente se encuentra en diversos ambientes, incluidos los sistemas de tratamiento de aguas residuales, aerosoles urbanos y placas orales (Maszenan et al., 2022; McIlroy & Seviour, 2009). Estas bacterias son reconocidas por su capacidad de eliminar fósforo y almacenarlo como polifosfato (Bessarab et al., 2022; Burow et al., 2007; Maszenan et al., 2022; McIlroy & Seviour, 2009).

La presencia del género *Defluviicoccus* en la piel sugiere que pueden estar participando en el metabolismo y la descomposición de HCs debido a sus características como organismos acumuladores de polifosfato (PAO). Los PAO utilizan carbono orgánico anaeróbicamente, almacenándolo como polímeros de reserva como los polihidroxicanoatos (Bessarab et al., 2022; Burow et al., 2007; Maszenan et al., 2022; McIlroy & Seviour, 2009). Es probable que estas bacterias prosperen debido a su capacidad para metabolizar HCs o porque estos compuestos crean las condiciones óptimas de crecimiento en la piel.

El género *Dietzia* también mostró un aumento notable en la piel de los individuos E comparado a los NE.

Este grupo de actinobacterias aerobias Gram positivas son comúnmente encontradas en ambientes acuáticos y terrestres, así como en muestras clínicas, por ejemplo, de infecciones de la piel (Gharibzahedi et al., 2014; Jones et al., 2008; Koerner et al., 2009). Una característica particular del género *Dietzia*, es la habilidad de degradar hidrocarburos y otras sustancias orgánicas complejas (Jones et al., 2008; Koerner et al., 2009). Esta característica podría conferir capacidades patogénicas a *Dietzia*, permitiéndole colonizar la piel humana (Koerner et al., 2009). A pesar de también estar presente en la piel de los individuos NE y de las frecuentes observaciones en muestras epidérmicas humanas, las cepas de *Dietzia* no han sido clasificadas como parte de la microbiota cutánea nativa (Dekio et al., 2007; Z. Gao et al., 2007; Koerner et al., 2009). Esto sugiere una posible adquisición a través de una exposición específica o mediante vectores de transmisión (Koerner et al., 2009). La mayor prevalencia de *Dietzia* entre los individuos E sugiere un posible rol de estas en el procesamiento y la descomposición de los HCs en la superficie cutánea.

El género bacteriano *Microvirga*, igualmente mostró una mayor abundancia relativa en la piel de los individuos E. Estas bacterias aeróbicas Gram negativas, se encuentran principalmente en el suelo y son reconocidas por su capacidad de fijar nitrógeno y establecer relaciones simbióticas con las plantas (Ardley et al., 2012; Caputo et al., 2016; Msaddak et al., 2017; Tapase et al., 2017; X. Zhang et al., 2022). Aunque normalmente no se le considera un miembro de la microbiota cutánea humana, se ha reportado su presencia en la piel, así como en el intestino y en las muestras de heces de individuos sanos (Boxberger et al., 2021; Caputo et al., 2016, 2019; Lagier et al., 2012).

La presencia significativa de *Microvirga* en la piel de los individuos expuestos a HCs puede atribuirse a la capacidad de este género bacteriano de metabolizar estos compuestos. Estudios indican que algunas cepas de *Microvirga* son capaces de metabolizar contaminantes orgánicos (Y.-J. Li et al., 2022) y prosperar en la cercanía a suelos contaminados con desechos (Tapase et al., 2017).

Nocardioides fue otro género de los géneros que mostró una mayor abundancia relativa en la piel de las muestras E. Al igual que el género previamente mencionado, *Mycobacterium*, *Nocardioides* también es conocido por su capacidad para degradar hidrocarburos y su potencial patogénico. El género *Nocardioides* está compuesto por Actinobacterias aeróbicas Gram positivas que se encuentran en varios ambientes, incluyendo suelo, agua, aguas residuales industriales, superficies de plantas y columnas de esquisto de petróleo (Collins et al., 1994; Lawson et al., 2000; Prauser et al., 1997; J. H. Yoon et al., 1997, 1999; J.-H. Yoon & Park, 2006). Varios informes han vinculado las especies de *Nocardioides* a infecciones humanas, particularmente en individuos inmunocomprometidos o aquellos con condiciones respiratorias delicadas (Doyle et al., 2023; Hemmersbach-Miller et al., 2018; Lotte et al., 2020; Toyokawa et al., 2021; Wilson,

2012). Se han aislado cepas de *Nocardioides* con capacidades hidrocarbonoclasticas de ambientes contaminados con petróleo (L. M. Brown et al., 2017; C. M. Jung et al., 2002; Kubota et al., 2005), y el análisis de su genoma reveló la presencia de genes que codifican para monooxigenasas de alcano (L. M. Brown et al., 2017). Aunque las especies de *Nocardioides* pueden aislarse de la piel (Lotte et al., 2020; Steinbrink et al., 2018; Zhuang et al., 2021), su presencia es una señal de alerta debido a su naturaleza patogénica. El incremento significativo de *Nocardioides* en los sujetos E, puede estar vinculada a sus mencionadas habilidades de degradación de HCs, lo que, a su vez, puede indicar un riesgo elevado de infecciones en estos individuos.

Rheinheimera fue otro género que también mostró una diferencia significativa en su abundancia en presencia de HCs. Este género comprende bacterias aeróbicas Gram negativas y pertenece al filo Proteobacteria. Por lo general, se pueden encontrar en varios entornos acuáticos como agua dulce, hábitats marinos, aguas residuales industriales y urbanas, así como en plantas y suelos (Becerra-Castro et al., 2016; W.-M. Chen et al., 2019; Joura et al., 2021; Kumar et al., 2015; Panda et al., 2020; Romanenko et al., 2015; Ryu et al., 2008; Yu et al., 2020; W. Zhang, Zhu, et al., 2020). *Rheinheimera* en términos de salud humana se ha asociado con bacteremia (Kuchly et al., 2020), así como con una mayor presencia en pacientes con rosácea (Joura et al., 2021; Yun et al., 2019). Además, se ha encontrado que *Rheinheimera* tiene el potencial de ser utilizada para fines de biorremediación debido a su capacidad para degradar HCs (Cappello et al., 2016). El incremento de su abundancia en presencia de derivados de HCs sugiere su posible participación en el metabolismo o degradación de estos compuestos. Se necesita más investigación para entender los mecanismos por los cuales *Rheinheimera* responde a los HCs y cómo puede contribuir a la salud del huésped.

Rubellimicrobium, una bacteria gramnegativa que prospera en ambientes anaeróbicos, mostró un aumento significativo en prevalencia en las muestras E en comparación con las NE. Perteneciente a la clase Alphaproteobacteria, *Rubellimicrobium* se distribuye ampliamente en varios hábitats, incluyendo suelo, líquenes, depósitos de máquinas papeleras y partículas de aire en forma de aerosol (Denner et al., 2006; Han et al., 2023; Iakovides et al., 2022; Weon et al., 2009; L. Yang et al., 2022).

Existe una creciente preocupación por el riesgo potencial de exposición a microorganismos como *Rubellimicrobium* y sus implicaciones para la salud humana. Estos microorganismos pueden actuar como patógenos oportunistas, y los cambios ambientales están aumentando la probabilidad de exposición. Por ejemplo, un estudio realizado por Liu Yang *et al.* (L. Yang et al., 2022) encontró que *Rubellimicrobium* era uno de los géneros predominantes de bacterias transportadas por el aire tanto durante los días de neblina

como sin neblina en Xi'an, China. Este microorganismo, mostró una correlación positiva con la capacidad de oxidación atmosférica en los días de neblina, sugiriendo su resistencia al estrés oxidativo en comparación con otras bacterias. Esto resalta la importancia de abordar los bioaerosoles como un problema ambiental significativo.

Además, un estudio realizado por Iakovides *et al.* (Iakovides *et al.*, 2022) encontró que *Rubellimicrobium* era uno de los géneros dominantes en muestras de aerosoles, indicando su capacidad para prosperar en condiciones desafiantes durante el transporte, como la desecación, la radiación UV y la disponibilidad limitada de nutrientes. *Rubellimicrobium* mostró una fuerte tendencia a coexistir con otras bacterias durante eventos de polvo, sugiriendo interacciones potenciales o nichos ecológicos compartidos. También se identificó la presencia de *Rubellimicrobium* en lesiones de neoplasia intraepitelial cervical en mujeres (Vikramdeo *et al.*, 2022; J. Wang *et al.*, 2020), lo que sugiere su posible papel como patógeno en el desarrollo del epitelio cervical en un estado neoplásico.

Se ha observado que *Rubellimicrobium* está asociado con la degradación de microplásticos (Mamtimin *et al.*, 2023), lo que implica su capacidad para degradar hidrocarburos de petróleo, explicando potencialmente su presencia significativa en muestras de E.

Un género bacteriano que presentó una disminución en abundancia relativa en las muestras de los sujetos E fue *Peptoniphilus*. Su mayor abundancia en los sujetos NE, sugiere que la exposición a HCs podría inhibir a este género en los sujetos E. El género *Peptoniphilus* está típicamente presente en la microbiota humana y se le puede encontrar en varias ubicaciones, como el sistema genitourinario, el intestino, la cavidad oral y la piel (Chattopadhyay *et al.*, 2021; Egert *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 1978; Gontcharova *et al.*, 2010; Murdoch, 1998; Murphy & Frick, 2013). Estas bacterias Gram positivas anaeróbicas se han asociado con infecciones oportunistas y se han vinculado a condiciones clínicas que incluyen infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones del tracto urinario, infecciones del torrente sanguíneo y endocarditis (Angrup *et al.*, 2022; K. Brown *et al.*, 2014; Gontcharova *et al.*, 2010; Murdoch, 1998; Murphy & Frick, 2013; Stein *et al.*, 2011). Curiosamente, Arikan y colaboradores encontraron una asociación entre la disminución en la abundancia del género *Peptoniphilus* y la enfermedad de Parkinson en su estudio (Arikan *et al.*, 2022), lo que refuerza la importancia del género *Peptoniphilus* para la salud humana. La inhibición que observamos puede atribuirse a los efectos tóxicos de los HCs en el crecimiento y supervivencia de este género, lo que podría conducir a efectos adversos en el huésped.

Según estudios previos, la diversificación de las comunidades microbianas incluye el enriquecimiento de

géneros bacterianos que se sabe poseen la capacidad de degradar los HCs. Se encontró que *Paracoccus*, que son bacterias Gram negativas del filo Proteobacteria, y *Williamsia*, una bacteria Gram positiva del filo Actinobacteria, fueron notablemente más abundantes en muestras de manos de individuos expuestos a HCs.

Paracoccus, un género comúnmente encontrado en la piel (Cosseau et al., 2016; Ross et al., 2018; van Rensburg et al., 2015), ha sido identificado como un patógeno oportunista (Daneshvar et al., 2003; Funke et al., 2004) y se ha demostrado que posee capacidades hidrocarbonoclasticas (Liu et al., 2019; Teng et al., 2010). Curiosamente, los estudios que investigan el impacto de HCs en la microbiota de la piel han indicado que la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se asocia con un aumento de la abundancia de especies de *Paracoccus* (Leung et al., 2020, 2023; Misra et al., 2021).

Williamsia también se ha asociado con la degradación de HCs (C. Li et al., 2023; Yassin et al., 2007) y se ha identificado como un patógeno oportunista en individuos con sistemas inmunológicos comprometidos (Keikha, 2018).

Estos resultados refuerzan que la exposición a derivados de HCs altera la composición de la microbiota de la piel, reduciendo la protección proporcionada por las bacterias beneficiosas y contribuyendo potencialmente a la presencia de cepas patogénicas (Leung et al., 2020).

4.3 Inferencia del estado metabólico a partir de la predicción de los genomas

La predicción de los metagenomas con PICRUSt permitió profundizar en la correlación entre la diversificación y enriquecimiento de los taxones bacterianos con sus capacidades hidrocarbonoclasticas, derivado de la exposición a HCs. Este análisis evidenció cambios en la abundancia de genes microbianos involucrados en distintas funciones metabólicas. Específicamente, mostró un notable aumento en la abundancia de secuencias vinculadas a la degradación de una amplia gama de hidrocarburos en muestras recolectadas de los individuos E, particularmente en sus manos (EH). Es preciso recordar que este sitio anatómico es el que regularmente entra en contacto directo con los HCs, ya que los individuos los manipulan sin las suficientes medidas de protección. Además, se observó un aumento en la presencia de genes relacionados con la producción de toxinas bacterianas y antibióticos. Las bacterias tienden a incrementar la síntesis de estas clases de compuestos cuando se enfrentan a la competencia con otras bacterias, el estrés o ante un posible daño (Cornforth & Foster, 2015). Este resultado sugiere que puede

existir competencia microbiana en la superficie de la piel ocasionada por cambios en la estructura de la comunidad microbiana, lo que a su vez puede promover el desarrollo de cepas potencialmente dañinas, todo esto como producto de la exposición a derivados de petróleo.

4.4 Metaboloma de la piel

Los resultados de la metabolómica basada en espectrometría de masas revelaron alteraciones significativas en el metaboloma de la superficie de la piel asociado a la exposición a HCs. El metaboloma obtenido después de aplicar nuestros filtros de calidad comprendió 804 atributos, con masas que abarcaron desde los 143.106 m/z hasta los 1310.996 m/z.

Una vez normalizados e imputados los datos, como primer paso para tener una comprensión general del metaboloma, se realizó un gráfico de componentes principales (PCA). A nivel de Cohorte se observó un claro patrón de agrupación en las muestras de individuos NE respecto a las E, que se mostraban más heterogéneas en su distribución. El mapa de calor confirmó aún más estos resultados, mostrando diferencias significativas en los perfiles de metabolitos entre individuos expuestos crónicamente a HCs y aquellos sin exposición.

A nivel de subcohorta los resultados fueron igualmente similares tanto en el PCA como en el mapa de calor. Curiosamente, en ambos análisis se observó que las muestras de EA compartían similitudes en sus perfiles metabolómicos con las muestras de EH, diferenciándose claramente respecto a sus contrapartes; esto sugiere un posible impacto general de HCs en la piel o una exposición indirecta a HCs en el brazo. Sin embargo, las diferencias en los niveles de metabolitos eran más notables en las muestras de EH y podrían atribuirse al hecho de que los HCs son moléculas químicas con amplia variedad de tamaños y formas (Eneh, 2011; McKee & White, 2014; «Petroleum Derivatives: Synthesis and Application», 2017) y las manos están frecuentemente expuestas a ellos debido a las actividades de manipulación. Además, se sabe que son capaces de alterar las estructuras celulares y desencadenar estrés celular (Kežić et al., 2010; Khanna & Gharpure, 2017; McKee & White, 2014; Mehlman, 1991; Olawoyin, 2012; Ragusa et al., 2021), lo que podría contribuir a los cambios de abundancia de algunos compuestos en las muestras EH.

Aunado a los interesantes resultados en el mapa de calor, el análisis de gráfico de volcán confirmó que existía un mayor número de metabolitos significativamente desregulados en las muestras de EH en comparación con NEH (229 metabolitos en total). En contraste, se identificaron menos metabolitos

desregulados significativos al comparar las muestras de EA y NEA (73 metabolitos en total). Estos resultados confirman que la exposición directa de las manos a los derivados de HCs tiene un mayor impacto en el metaboloma de la superficie de la piel en comparación con la exposición indirecta (muestras EA).

Es importante mencionar que solo hubo 18 anotaciones automáticas con bibliotecas espectrales públicas. El bajo nivel de anotación automática alcanzada (<0.2%), se puede deber al gran espacio químico de moléculas presentes en las muestras y la baja cantidad de registros en las bases públicas. Debido a ello y con el fin de obtener más información de las muestras, se enriquecieron los resultados utilizando herramientas que permiten minar los datos y hacer predicciones de moléculas *in silico*.

Basándose en la identificación de compuestos contra bibliotecas públicas y herramientas de predicción *in silico*, la superclase más abundante identificada fueron los lípidos y moléculas similares a lípidos. Estas moléculas están involucradas en una multitud de procesos biológicos y son reconocidas por numerosas enzimas, proteínas de unión y receptores (Fahy et al., 2005). Desempeñan roles esenciales en la regulación de diversos procesos biológicos, así como en enfermedades (Sud et al., 2007).

Las moléculas de lípidos y similares a lípidos no sólo se producen de forma natural, sino que también se encuentran en varios productos de cuidado personal (H. J. Lee et al., 2018; Mitura et al., 2020; Proksch & Lachapelle, 2005), incluyendo lociones, cremas y cosméticos. Además, se sabe que se ven significativamente afectados por la exposición a los derivados de HCs de petróleo, como se demostró en el estudio de Moreno-Ulloa y colaboradores. En su investigación, las moléculas de lípidos y similares a lípidos fueron la superclase más abundante en el medio, particularmente en los sedimentos que crecieron en presencia de HCs de petróleo.

Además, esta superclase química incluye a una gran cantidad de moléculas tales como: alcoholes, quinonas, hidroquinonas, etc. Algunos de estos compuestos se han reportado como productos del metabolismo microbiano de hidrocarburos (Brooijmans et al., 2009). Es importante señalar que debido a las condiciones cromatográficas en las que se adquirieron los datos (fase reversa) este tipo de moléculas son más susceptibles de identificar. No obstante, también es digno de resaltar que se identificaron otras superclases de moléculas con distintas polaridades, entre las que destacan: bencenoides, nucleósidos, nucleótidos y análogos, compuestos organooxygenados y fenilpropanoides y policétidos, entre otros.

Como ya se mencionó, uno de los principales desafíos que enfrenta la metabolómica utilizando

espectrometría de masas no dirigida es la ausencia de una biblioteca de referencia integral de metabolitos. Esta limitación dificulta la identificación y anotación precisa de los metabolitos detectados. Para abordar este desafío, se han propuesto varias estrategias, incluyendo el uso de redes neuronales para predecir clases de compuestos directamente a partir de datos de MS/MS sin depender de una biblioteca de referencia (Dührkop et al., 2021). CANOPUS es una herramienta que nos permite describir y comparar muestras basándonos en la distribución de clases de compuestos.

Es notable que ambas cohortes exhibieron un mayor número de compuestos detectados en sus manos en comparación con sus controles (brazos). En 2015, Bouslimani y sus colegas demostraron (Bouslimani et al., 2015) que la superficie de la piel de las manos tenía uno de los niveles más altos de diversidad molecular entre diferentes sitios del cuerpo. Posteriormente, nuevamente Bouslimani y colaboradores (Bouslimani et al., 2019) observaron variaciones en la diversidad molecular en la superficie de la piel en varios sitios del cuerpo. Encontraron que la cara y los brazos exhibían la mayor diversidad molecular en comparación con los pies y las axilas, tanto al principio como al final del estudio (cuando no se usaban productos cosméticos). Por lo que las diferencias en la diversidad molecular de las manos con respecto a otros sitios del cuerpo que nosotros observamos pueden atribuirse a una mayor exposición de las manos a una variedad más amplia de compuestos en el medio ambiente, incluyendo derivados de HC's de petróleo, dado que nuestras interacciones con el entorno que nos rodea a menudo implican el uso de nuestras manos.

En general, la mayoría de los atributos detectados en todas las muestras corresponden a ácidos carboxílicos y sus derivados (>30%). Esta clase química engloba compuestos como los aminoácidos y péptidos, que se encuentran comúnmente en los sistemas biológicos debido a sus roles esenciales e indican una superficie de la piel saludable (Solano, 2020). Son secretados por las células del huésped (Park et al., 2013) o producidos por la microbiota de la piel (Malik et al., 2016), para combatir a los patógenos. Su presencia también contribuye al pH ligeramente ácido de la piel, entre 4.8 y 5.8 (Burke et al., 1966; Solano, 2020), que es importante para el mantenimiento y regulación de la función de barrera de la piel (Costa & Horswill, 2022; Hachem et al., 2003; Proksch, 2018).

Los ácidos grasos, una de las ocho categorías de lípidos (Fahy et al., 2009), representaron la segunda clase de compuestos más abundante, constituyendo aproximadamente el 15% de las características detectadas. Esta categoría de lípidos biológicos juega un papel fundamental como bloques de construcción para la síntesis de lípidos complejos (Fahy et al., 2005). Engloba un amplio espectro de compuestos, incluyendo

ácidos grasos, que también contribuyen a la acidez de la superficie de la piel, así como ésteres de cera, isoprostanos, amidas grasas, entre otros (Fahy et al., 2005).

Es importante destacar que la presencia y abundancia de esta clase de compuestos puede estar vinculada a su producción por las glándulas sebáceas presentes en la piel. Estas glándulas secretan sebo, una sustancia compuesta por ácidos grasos libres, triglicéridos, ésteres de cera y escualeno (Costa & Horswill, 2022).

Los compuestos organonitrogenados fueron la tercera clase de compuestos más abundante detectada, representando aproximadamente el 9% de los atributos observadas. Esta clase engloba compuestos como aminas, sales de amonio, guanidinas, aminóxidos y N-arilamidas (Djoumbou Feunang et al., 2016).

La presencia de esta clase de compuestos en la superficie de la piel puede atribuirse a varios factores. Estos factores incluyen: las actividades metabólicas de las células de la piel (Gillbro et al., 2004; Kang et al., 2019; Lewis et al., 1972; Schallreuter et al., 1995; A. Slominski et al., 2005; A. T. Slominski et al., 2012), la producción de productos de desecho nitrogenados por los microorganismos residentes en la piel (Lewis et al., 1972), y la exposición a fuentes exógenas como los contaminantes ambientales (Ferraz et al., 2012; Korinth et al., 2006; Nakano et al., 2018; Palmiotto et al., 2001) o productos de cuidado personal que contienen compuestos nitrogenados (Kemper et al., 2010; Khalid & Abdollahi, 2021).

4.5 Diferencias en abundancia de las clases químicas

Los azoles son contaminantes ambientales emergentes debido a su uso en diversas industrias, como la agricultura, productos farmacéuticos y productos para el hogar (Dalvie et al., 2002; Shi et al., 2019; Taxvig et al., 2008). También están presentes en derivados del petróleo, como el combustible diésel (Zeuthen et al., 2001). Su presencia plantea preocupaciones eco toxicológicas y riesgos para la salud humana, ya que son potentes inhibidores del citocromo-p450, producen metabolitos tóxicos y tienen propiedades disruptivas endocrinas (Dalvie et al., 2002; Magnusson et al., 1972; Taxvig et al., 2008). Los cambios significativos en la abundancia de estos compuestos en individuos E en comparación con NE revelan posibles riesgos para la salud de los trabajadores expuestos a derivados del petróleo.

Los glicerolípidos también mostraron desregulación debido a la exposición a derivados del petróleo. Esta desregulación se observó tanto a nivel de cohorte como de subcohorte (EH vs NEH), con un aumento en

la abundancia de glicerolípidos en individuos expuestos. Los glicerolípidos son lípidos compuestos por una estructura de glicerol y de una a tres moléculas de ácidos grasos (Fantini & Yahi, 2015). Se ha reportado que ratones expuestos a hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) experimentaron cambios en el metabolismo de los glicerolípidos, con un aumento en los niveles de triglicéridos en el tejido hepático (F. Li et al., 2020). Esta desregulación sugiere una posible alteración en el metabolismo de los lípidos y puede contribuir a efectos nocivos en la piel.

Los hidroxiácidos y derivados son otra clase química que mostró cambios significativos en abundancia en respuesta a la exposición a hidrocarburos de petróleo. Tanto a nivel de cohorte como de subcohorte, los individuos no expuestos mostraron niveles más altos de metabolitos de esta clase. Estos compuestos se caracterizan por la presencia de al menos dos grupos carboxílicos o un grupo carboxílico y un grupo hidroxilo con una cetona (da Silva Júnior et al., 2017) actúan como intermediarios del metabolismo energético y regulan funciones inmunes y metabólicas al activar receptores específicos. Ejemplos de estos compuestos incluyen ácido láctico, ácido 3-hidroxi-butírico y ácido 3-hidroxi-octanoico (Offermanns, 2017).

Es importante señalar que los hidroxiácidos y sus derivados son comunes en productos cosméticos y de cuidado de la piel, y se utilizan en tratamientos dermatológicos por su efectividad contra la sequedad, líneas, arrugas, hiperpigmentación y acné (Farris, 2018; Lynch & Schwarz, 2010; Obagi, 2018; Obagi & Gandhi, 2017). La desregulación de estos compuestos se ha relacionado con afecciones como la psoriasis (Hanson et al., 2010) y otros trastornos de la piel (Offermanns, 2017). Algunos trastornos relacionados con la exposición a hidrocarburos podrían estar vinculados a la desregulación de hidroxiácidos y derivados en la piel.

Solo en la comparación EH vs NEH del grupo de subcohorte, los niveles de abundancia de ácidos carboxílicos y derivados mostraron un aumento significativo en las muestras de EH. Esta clase incluye varios compuestos, como los propios ácidos carboxílicos. Los mayores niveles de estos metabolitos pueden atribuirse al metabolismo de aminoácidos y péptidos, así como a la conversión de hidrocarburos de petróleo en ácidos carboxílicos. Los ácidos carboxílicos son metabolitos centrales en las vías de degradación de hidrocarburos en bacterias (Bian et al., 2015; Jacques et al., 2007; Peng et al., 2008; Selesi & Meckenstock, 2009). Alternativamente, estos cambios podrían ser resultado de perturbaciones inducidas por los HCs en células de mamíferos, ya que la exposición a estos se ha asociado con trastornos en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (P. Gao et al., 2018; Potratz et al., 2016; Ye et al., 2019) y un

aumento en los niveles de ácidos orgánicos debido a la peroxidación lipídica causada por el estrés oxidativo (Z. Wang et al., 2015).

El aumento en la abundancia de los ácidos carboxílicos y derivados fue específico para las manos de los individuos expuestos, lo que se alinea con el hecho de que esta es la parte del cuerpo que interactúa directamente con los derivados del petróleo, especialmente en ausencia de medidas de protección.

Los ácidos grasos mostraron niveles de abundancia más bajos en muestras de EH en comparación con NEH. Este grupo de sustancias químicas es significativo en términos de lípidos biológicos y abarca principalmente ácidos grasos, caracterizados por grupos metileno consecutivos que contribuyen a su naturaleza hidrofóbica (Fahy et al., 2005).

Tanto los estudios *in vitro* (F. Wang et al., 2018) como *in vivo* (F. Li et al., 2020) indican que la exposición a los HAP produce niveles reducidos de ácidos grasos, sugiriendo una posible alteración del metabolismo de los lípidos.

El estrato córneo de la piel contiene glándulas sebáceas que producen sebo, compuesto por ácidos grasos libres, triglicéridos, escualeno, cera y ésteres de esteroles. Estos componentes son cruciales para mantener la integridad y el equilibrio de humedad de la piel (Honari & Maibach, 2014). La mayoría (hasta el 95 %) de los ácidos grasos en la piel se producen a través de la actividad de la lipasa de *Cutibacterium acnes* sobre los triglicéridos del sebo (Freinkel et al., 1965; Marples et al., 1971; Toyoda & Morohashi, 2001). *C. acnes* es una bacteria común en nuestra microbiota cutánea (Allhorn et al., 2016; Almoughrabie et al., 2023; Christensen & Brüggemann, 2014) y su metabolismo inhibe el crecimiento de bacterias patógenas y mantiene el equilibrio cutáneo (Almoughrabie et al., 2023; M. Yang et al., 2020).

La disminución de ácidos grasos en la piel en muestras de EH podría deberse a la inhibición de bacterias comensales o a una alteración de la síntesis de lípidos por los queratinocitos, ambos potencialmente causados por la exposición a HCs.

Además de los glicerolípidos, los glicerofosfolípidos también mostraron una mayor abundancia, pero solo en la comparación entre EH y NEH. Los glicerofosfolípidos son lípidos caracterizados por diglicéridos de ácidos grasos con un éster de fosfatidilo unido al carbono terminal de la cadena principal de glicerol (Fahy et al., 2005; Tao, 2007). Desempeñan papeles cruciales como componentes de las membranas celulares, sitios de unión para proteínas y precursores o segundos mensajeros (Fahy et al., 2005).

Estudios previos han reportado un aumento en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los glicerofosfolípidos y una elevación en la abundancia de estas moléculas tras la exposición a HAP (F. Li et al., 2020; Potratz et al., 2016; F. Wang et al., 2018). Se han propuesto varias hipótesis para explicar este aumento, incluida la posible alteración de la actividad, funcionalidad e integridad de la membrana (F. Li et al., 2020; Potratz et al., 2016), la inducción de la señalización del receptor de hidrocarburos arílicos canónicos (Potratz et al., 2016) y la estimulación de la actividad de la enzima PLA2 (F. Wang et al., 2018).

En 2020, Leung *et al.* (Leung et al., 2020) investigaron la respuesta de la microbiota de la piel humana a la exposición a HAP y encontraron una asociación entre la exposición a HAP y un aumento de los genes asociados con el metabolismo de los glicerofosfolípidos. Sin embargo, en nuestra predicción funcional utilizando PICRUST, encontramos que los genes relacionados con el metabolismo de los glicerofosfolípidos eran más abundantes en manos de individuos no expuestos. Esto sugiere que los cambios observados en el metabolismo de los glicerofosfolípidos en respuesta a HAP podrían no deberse al metabolismo bacteriano, sino que apoya la hipótesis de que la exposición crónica a derivados de HCs puede alterar el metabolismo de los lípidos.

En cuanto a la clase química de los cetoácidos y derivados, se encontraron resultados interesantes en ambos niveles. A nivel de cohorte, estas moléculas son más abundantes en muestras NE en comparación con las muestras E. A nivel de subcohorte, en ambas comparaciones (EH vs NEH y EA vs NEA), los cetoácidos y derivados estaban subregulados en muestras de individuos expuestos a HCs (EH y EA).

Los cetoácidos y derivados, también conocidos como oxoácidos, son compuestos orgánicos que contienen un grupo cetona y un grupo ácido carboxílico (A. Wong & Poli, 2014). Existen varios tipos, como los α -cetoácidos, β -cetoácidos y γ -cetoácidos, cuya nomenclatura depende de la posición del grupo ceto en relación con la fracción de ácido carboxílico. Los α -cetoácidos desempeñan roles importantes en el ciclo de Krebs y la glucólisis (A. Wong & Poli, 2014). Otra fuente de oxoácidos es la β -oxidación, donde los ácidos grasos se convierten en acetyl-CoA (Batsika et al., 2021; Parsons & Rock, 2013; Świzdor et al., 2012). Este proceso ocurre en mitocondrias y peroxisomas, contribuyendo al metabolismo energético (Świzdor et al., 2012). Otros oxoácidos, con diferentes posiciones de la funcionalidad oxo en la cadena de carbono, cumplen diversas funciones en la salud humana (Baron et al., 2005; Batsika et al., 2021; Cossette et al., 2008; Zheng et al., s. f.). La menor presencia de cetoácidos y derivados en muestras expuestas a HCs puede estar asociada con una expresión reducida de hidroxiácidos y acilos grasos, resaltando alteraciones en el metabolismo de los lípidos.

La clase de compuestos organooxygenados también mostró un aumento significativo tanto a nivel de cohorte como de subcohorte, específicamente en las muestras EH en comparación con las NEH. Esta clase incluye compuestos orgánicos con un enlace carbono-oxígeno, como carbohidratos, éteres, compuestos carbonílicos, alcoholes y polioles (Djoumbou Feunang et al., 2016). Algunos de estos compuestos son intermediarios o productos finales en la biodegradación del petróleo en entornos contaminados (Mohler et al., 2013, 2020; Nabi et al., 2017).

La biodegradación microbiana de hidrocarburos comienza con una reacción de activación, que puede ocurrir en condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Laczi et al., 2020). En vías aeróbicas, la activación de hidrocarburos implica mono y dioxigenasas que utilizan oxígeno molecular para convertir los hidrocarburos en alcoholes. En condiciones anaeróbicas, se utilizan reacciones como la adición de fumarato, hidroxilación independiente del oxígeno, carboxilación directa, hidratación y metanogénesis inversa (Laczi et al., 2020).

En humanos, el metabolismo de hidrocarburos comienza con enzimas de fase I, que producen intermediarios oxigenados, y continúa con enzimas de fase II que los convierten en productos más polares (Shimada, 2006). Estos intermediarios son altamente reactivos y pueden formar aductos de ADN (Ewa & Danuta, 2017; P. Gao et al., 2018; Potratz et al., 2016; Shimada & Fujii-Kuriyama, 2004).

Las monooxigenasas dependientes del citocromo P450 (CYP) son cruciales en el metabolismo de hidrocarburos tanto en bacterias (Funhoff et al., 2006; Laczi et al., 2020) como en humanos (Potratz et al., 2016; Shimada, 2006; Shimada & Fujii-Kuriyama, 2004). Según las predicciones de PICRUST, las muestras de EH mostraron niveles elevados de genes relacionados con la degradación del PH, incluyendo la vía del citocromo P450, en comparación con NEH.

La piel sana generalmente tiene niveles bajos de oxígeno molecular (Fyhrquist et al., 2019; Tholen et al., 2016), indicando un metabolismo cutáneo anaeróbico. Sin embargo, los géneros *Williamsia* y *Alkanindiges*, que aumentaron significativamente en EH, son bacterias estrictamente aeróbicas, mientras que *Paracoccus* puede tener un metabolismo aeróbico o anaeróbico facultativo. Esto sugiere un cambio hacia el metabolismo aeróbico en la piel, lo que podría explicar el aumento de compuestos organooxygenados asociados con el metabolismo de hidrocarburos en la superficie de la piel.

Otra clase química que presentó un aumento notable en su abundancia fue la clase de los éteres fenólicos tanto en las muestras E así como en las EH. Los éteres fenólicos son compuestos orgánicos caracterizados

por la fórmula general Ar–O–R, donde Ar representa un anillo de fenilo sustituido o no sustituido (Sánchez et al., 2019). Estos compuestos son contaminantes ambientales presentes en el petróleo y sus derivados (Fayolle et al., 2001; MacCrehan & Brown-Thomas, 1987; Min & Wen, 1982; Schlüter & Schauer, 2017; Wittich, 1998; Yoshimoto et al., 1990). También son biodegradados por comunidades microbianas con actividad hidrocarbonoclástica (Fayolle et al., 2001; Karlson et al., 1993; Y.-H. Kim & Engesser, 2004; Schlüter & Schauer, 2017; White et al., 1996) y pueden generarse como metabolitos secundarios a través del metabolismo microbiano (H. Gao et al., 2013; M. V. Nguyen et al., 2022).

Una inspección manual de las anotaciones CANOPUS y CSIFingerID reveló que estos compuestos están estructuralmente relacionados con la vía de los alcaloides, según el Clasificador de Productos Naturales (NPC) (H. W. Kim et al., 2021) incluido en la última versión de SIRIUS. Esto coincide con los hallazgos previos de PICRUST, donde los genes funcionales relacionados con la “biosíntesis de alcaloides indólicos” estaban sobrerrepresentados en muestras de EH en comparación con NEH. Algunas bacterias pueden producir alcaloides para competir y defenderse de otros microorganismos (Kishimoto et al., 2016; Klapper et al., 2016; Lozano et al., 2019).

La mayor abundancia de éteres fenólicos en muestras de E y EH podría explicarse por un aumento en los genes funcionales relacionados con la biosíntesis de alcaloides, sugiriendo competencia bacteriana en la superficie de la piel debido a la exposición a HCs.

La clase de lípidos prenólicos (LP) mostró una disminución significativa en abundancia en la cohorte E, particularmente en sus muestras EH. Los LP son sintetizados por organismos eucariotas y bacterias a partir de los precursores de 5 carbonos isopentenil difosfato y dimetilalil difosfato a través de la vía del mevalonato. Estos lípidos son cruciales para sintetizar varios compuestos bioactivos, incluidas hormonas esteroideas, carotenoides, ácidos biliares y quinonas (Donato et al., 2023; Fahy et al., 2005; Karlic & Varga, 2019). Los cambios en los niveles de LP se han relacionado con varias patologías, como la encefalopatía hipóxico-isquémica, el síndrome coronario agudo y las perturbaciones cerebrales (Hu et al., 2021; W. Zhang, Song, et al., 2020).

Además, se ha encontrado que los pacientes con acné tienen niveles disminuidos de LP en la superficie de la piel en comparación con los pacientes sin acné (Ding et al., 2022; Zhou et al., 2018). De manera similar, las personas que fuman y las mujeres mayores muestran niveles disminuidos de LP en la capa externa de la piel de sus manos en comparación con los no fumadores y las personas más jóvenes, respectivamente (T. Chen, Wang, et al., 2023; T. Chen, Zhao, et al., 2023). Pham *et al.* (Pham et al., 2015) propusieron que

el escualeno, un LP presente en el sebo de la superficie de la piel, puede servir como un antioxidante endógeno, proporcionando efectos protectores contra sustancias nocivas como los contaminantes. Además, sugirieron que el escualeno podría desempeñar un papel en el control de los niveles de oxígeno para los microorganismos anaeróbicos beneficiosos presentes en la piel.

La disminución en la abundancia de lípidos prenólicos observada en la superficie de la piel de individuos expuestos a HCs refuerza la alteración previamente observada del metabolismo lipídico, sugiriendo efectos adversos sobre la salud de la piel y potencialmente relacionados con la desregulación de la microbiota.

4.6 Correlación bacterias-metabolitos

Como se mencionó anteriormente, la presencia y abundancia de ciertos compuestos en la superficie de la piel es un fenómeno natural que puede diferir entre individuos, partes del cuerpo y rutinas. Sin embargo, cambios significativos en la abundancia de metabolitos de clases específicas sugieren alteraciones debidas a la exposición a HAP.

Los procesos metabólicos de la piel están estrechamente relacionados con el metabolismo de la microbiota residente, y los cambios en uno pueden impactar al otro (Ashrafi et al., 2020; Emmert et al., 2021; E. S. Jung et al., 2019). Al analizar los datos de metabolómica y metabarcoding en conjunto, identificamos funciones microbianas y observamos las respuestas del huésped a la exposición crónica al PH en nuestros participantes.

Nuestro análisis reveló una relación más fuerte entre el microbioma y el metaboloma en individuos NE, particularmente en muestras NEH, como lo indica el análisis de Procrustes y coinercia. A pesar de las diferencias en los microambientes de la epidermis de brazos y manos, observamos un patrón de agrupamiento entre las muestras de ambos en ambos conjuntos de datos, sugiriendo una composición similar. En contraste, se observó una mayor disimilitud en los individuos E, sugiriendo que la exposición crónica al PH puede alterar la relación entre el microbioma y los metabolitos.

Además, las muestras de EH exhiben una mayor dispersión y no tienden a formar grupos en comparación con las muestras de NEH. Esta diferencia en las muestras EH puede deberse a variaciones individuales en respuesta a la exposición a HCs o bien, diferencias en las interacciones ocupacionales con los HCs, como

trabajar en talleres de reparación de automóviles o neumáticos que implican distintos niveles de exposición y producen la evidente disimilitud entre las muestras del mismo grupo.

Sin embargo, los individuos de la cohorte E mostraron patrones similares en abundancia bacteriana y perfiles de metabolitos. El análisis de correlación indicó que la presencia de los filos Proteobacteria y Actinobacteria se asoció con un aumento en varias clases químicas como ésteres fenólicos, compuestos organooxygenados, glicerolípidos, benceno y derivados sustituidos, lignanos furanoides, entre otros. Por el contrario, hubo una correlación negativa entre Firmicutes y estas clases de compuestos, sugiriendo una posible alteración en la abundancia de Firmicutes en la superficie de la piel debido a la exposición crónica a HCs.

Además, se observó una notable asociación entre ciertas bacterias (como *Dietzia*, *Paracoccus* y *Kocuria*) encontradas en las manos de individuos E y derivados de ácidos grasos como el ácido 11-cianoundecanoico y el ácido 12-amino-7-oxododecanoico. Estos derivados están potencialmente vinculados al metabolismo de HCs porque están asociados con la síntesis de polihidroxicianocarbocilatos (PHA) (Dake, 2015; Kenny et al., 2008). El PHA puede sintetizarse a partir de hidrocarburos cuando hay un exceso de carbono, una capacidad común entre las especies bacterianas con capacidades hidrocarbonoclasticas (Dake, 2015; Kenny et al., 2008; Sabirova, 2010).

Curiosamente, también se observó una notable correlación negativa entre la característica (469.375_28.524), identificada como un metabolito de la vitamina D llamado 25-hydroxy-26,27-dimethylvitamin D3/25-hydroxy-26,27-dimethylcholecalciferol, y la abundancia de *Dietzia*, *Kocuria*, *Romboutsia* y *Williamsia*. La vitamina D es una prohormona esteroide esencial para las funciones paracrinas y autocrinas del organismo (Bocheva et al., 2021; Mostafa & Hegazy, 2015; Vanchinathan & Lim, 2012). Es producida por la piel y convertida en metabolitos activos que contribuyen a la homeostasis cutánea y a la función de barrera, así como a la modulación de la inmunidad cutánea (Bikle, 2012, 2020; Bocheva et al., 2021; Hewison, s. f.; Martens et al., 2020; Mostafa & Hegazy, 2015; Reichrath et al., 2007, 2016; A. Slominski, Kim, et al., 2013; A. Slominski, Zbytek, et al., 2013; A. T. Slominski et al., 2016; Tuckey et al., 2019). Además, la vitamina D tiene propiedades antimicrobianas (Youssef et al., 2011) y su deficiencia puede afectar la salud general, el envejecimiento y la longevidad (Bocheva et al., 2021; MacLaughlin & Holick, 1985). La exposición a HCs puede afectar la producción de esta prohormona en la piel, creando condiciones que pueden promover la colonización por microorganismos patógenos.

Capítulo 5. Conclusiones

La exposición ocupacional a grasas, aceites y lubricantes industriales es una situación común para mecánicos y llanteros en México, donde las medidas de protección son frecuentemente inadecuadas y la regulación en el sector es limitada. Este estudio evidenció que las áreas de la piel con exposición crónica a HCs, como las manos, muestran una mayor diversidad y una comunidad bacteriana distinta en comparación con zonas no expuestas. Asimismo, estas áreas exhiben un espacio químico característico, sugiriendo un entorno favorable para la proliferación de bacterias capaces de degradar HCs.

Aunque el estudio no evaluó directamente el impacto de estos cambios en la salud de los participantes, los cambios moleculares observados sugieren posibles implicaciones para la salud, que deberán explorarse en investigaciones futuras. Estos estudios deberán considerar si las alteraciones observadas representan un riesgo para la salud o si actúan como mecanismos compensatorios en respuesta a la exposición a HCs. A pesar del tamaño reducido de la muestra, la inclusión de controles intra e intersujetos mejoró la fiabilidad de los resultados al permitir comparaciones directas entre zonas de piel expuestas y no expuestas dentro del mismo individuo.

En conclusión, los hallazgos de este estudio representan un primer paso significativo en la comprensión de la microbiota cutánea en trabajadores expuestos a HCs. Dada la prevalencia de la exposición a HCs en diversas industrias y áreas urbanas contaminadas, es crucial llevar a cabo investigaciones futuras que incorporen metodologías avanzadas, como la transcriptómica, la proteómica y la metagenómica, complementadas con evaluaciones dermatológicas detalladas. Además, es esencial ampliar el tamaño de la muestra, incluir una mayor diversidad étnica, realizar estudios en mujeres y explorar diferentes tipos de hidrocarburos. Estos esfuerzos permitirán esclarecer las consecuencias químicas, microbiológicas, fisiológicas y clínicas de la exposición, protegiendo así la salud cutánea de las personas.

Además de los estudios futuros sugeridos, se recomienda que las industrias involucradas en la manipulación de HCs consideren la implementación de medidas preventivas más estrictas para proteger la salud cutánea de los trabajadores.

Capítulo 6. Perspectivas

Para profundizar en el entendimiento de este fenómeno, las investigaciones futuras deberían enfocarse en ampliar el tamaño de la muestra e incluir una población más diversa para validar estos resultados y mejorar su generalización. Es de suma importancia que se incluyan personas de género femenino en esta clase de estudios, ya que la información recolectada al respecto sigue siendo escasa. Además, son necesarios estudios longitudinales para comprender los efectos a largo plazo de la exposición a los hidrocarburos en la salud de la piel y las comunidades microbianas.

La combinación de metagenómica, metabolómica, transcriptómica y proteómica podría proporcionar una comprensión más completa de los mecanismos moleculares subyacentes a los cambios observados en la microbiota y el metabolismo de la piel. Este enfoque integrador puede revelar nuevos biomarcadores para la detección temprana de trastornos cutáneos relacionados con la exposición a los hidrocarburos.

La investigación de posibles medidas de protección, como guantes y mascarillas, aunado al posible uso de probióticos o potenciadores de la barrera cutánea, podrían mitigar los efectos adversos de la exposición a los hidrocarburos. Estas intervenciones podrían probarse tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* para evaluar su eficacia y seguridad.

Este estudio destaca la necesidad de normas más estrictas y directrices de protección para los trabajadores de industrias con una alta exposición a los hidrocarburos. Las campañas de salud pública deberían concienciar sobre los posibles riesgos y promover medidas preventivas para proteger la salud de la piel.

Los estudios futuros deberían aprovechar los avances en las tecnologías de secuenciación y las herramientas bio- y quimio- informáticas para lograr una mayor resolución y precisión en los perfiles microbianos y de metabolitos. Esto podría conducir a una identificación más precisa de los taxones microbianos y las vías metabólicas afectadas por la exposición a los hidrocarburos en células procariontes y eucariontes.

Literatura citada

- Agarwal, S., & Krishnamurthy, K. (2024). Histology, Skin. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537325/>
- Ali, N., Khanafer, M., & Al-Awadhi, H. (2022). Indigenous oil-degrading bacteria more efficient in soil bioremediation than microbial consortium and active even in super oil-saturated soils. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 950051. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.950051>
- Allali, I., Arnold, J. W., Roach, J., Cadenas, M. B., Butz, N., Hassan, H. M., Koci, M., Ballou, A., Mendoza, M., Ali, R., & Azcarate-Peril, M. A. (2017). A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. *BMC Microbiology*, *17*(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1101-8>
- Allhorn, M., Arve, S., Brüggemann, H., & Lood, R. (2016). A novel enzyme with antioxidant capacity produced by the ubiquitous skin colonizer *Propionibacterium acnes*. *Scientific Reports*, *6*(1), 36412. <https://doi.org/10.1038/srep36412>
- Almoughrabie, S., Cau, L., Cavagnero, K., O'Neill, A. M., Li, F., Roso-Mares, A., Mainzer, C., Closs, B., Kolar, M. J., Williams, K. J., Bensinger, S. J., & Gallo, R. L. (2023). Commensal *Cutibacterium acnes* induce epidermal lipid synthesis important for skin barrier function. *Science Advances*, *9*(33), eadg6262. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg6262>
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, *59*(1), 143-169. <https://doi.org/10.1128%2Fmr.59.1.143-169.1995>
- Amir, A., McDonald, D., Navas-Molina, J. A., Kopylova, E., Morton, J. T., Zech Xu, Z., Kightley, E. P., Thompson, L. R., Hyde, E. R., Gonzalez, A., & Knight, R. (2017). Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. *mSystems*, *2*(2), e00191-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00191-16>
- Andrew, S. (2010). *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data* (Versión 0.12.0) [Software]. Braham Institute. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Angrup, A., Sood, A., Ray, P., & Bala, K. (2022). Clinical anaerobic infections in an Indian tertiary care hospital: A two-year retrospective study. *Anaerobe*, *73*, 102482. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102482>
- Arda, O., Göksügür, N., & Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology*, *32*(1), 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.021>
- Ardley, J. K., Parker, M. A., De Meyer, S. E., Trengove, R. D., O'Hara, G. W., Reeve, W. G., Yates, R. J., Dilworth, M. J., Willems, A., & Howieson, J. G. (2012). *Microvirga lupini* sp. Nov., *Microvirga lotononidis* sp. Nov. And *Microvirga zambiensis* sp. Nov. Are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *62*(Pt 11), 2579-2588. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.035097-0>

- Arifin, A. R., Reiter, N. H., May, T. W., & Linde, C. C. (2022). New species of *Tulasnella* associated with Australian terrestrial orchids in the subtribes Megastylidinae and Thelymitrinae. *Mycologia*, 114(2), 388-412. <https://doi.org/10.1080/00275514.2021.2019547>
- Arikan, M., Yildiz, Z., Kahraman Demir, T., Yilmaz, N. H., Sen, A., Hanoglu, L., & Yildirim, S. (2022). Axillary Microbiota Is Associated with Cognitive Impairment in Parkinson's Disease Patients. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e0235821. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02358-21>
- Aron, A. T., Gentry, E. C., McPhail, K. L., Nothias, L.-F., Nothias-Esposito, M., Bouslimani, A., Petras, D., Gauglitz, J. M., Sikora, N., Vargas, F., van der Hooft, J. J. J., Ernst, M., Kang, K. B., Aceves, C. M., Caraballo-Rodríguez, A. M., Koester, I., Weldon, K. C., Bertrand, S., Roullier, C., ... Dorrestein, P. C. (2020). Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature Protocols*, 15(6), 1954-1991. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5>
- Ashrafi, M., Xu, Y., Muhamadali, H., White, I., Wilkinson, M., Hollywood, K., Baguneid, M., Goodacre, R., & Bayat, A. (2020). A microbiome and metabolomic signature of phases of cutaneous healing identified by profiling sequential acute wounds of human skin: An exploratory study. *PLoS ONE*, 15(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229545>
- Ávila-Rodríguez, V., Nava-Camberos, U., Alvarado-Gómez, O. G., Czaja, A., Romero-Méndez, U., & Estrada-Rodríguez, J. L. (2018). Identificación Molecular de Especies de *Spalangia* Mediante los Espaciadores Internos Transcritos (ITS1 e ITS2) del ADNr. *Southwestern Entomologist*, 43(1), 209-220. <https://doi.org/10.3958/059.043.0113>
- Baron, J. M., Heise, R., Blaner, W. S., Neis, M., Jousen, S., Dreuw, A., Marquardt, Y., Saurat, J.-H., Merk, H. F., Bickers, D. R., & Jugert, F. K. (2005). *Retinoic Acid and its 4-Oxo Metabolites are Functionally Active in Human Skin Cells In Vitro*. 125(1), 143-153. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23791.x>
- Bartram, A. K., Lynch, M. D. J., Stearns, J. C., Moreno-Hagelsieb, G., & Neufeld, J. D. (2011). Generation of Multimillion-Sequence 16S rRNA Gene Libraries from Complex Microbial Communities by Assembling Paired-End Illumina Reads. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11), 3846-3852. <https://doi.org/10.1128/AEM.02772-10>
- Batsika, C. S., Mantzourani, C., Gkikas, D., Kokotou, M. G., Mountanea, O. G., Kokotos, C. G., Politis, P. K., & Kokotos, G. (2021). Saturated Oxo Fatty Acids (SOFAs): A Previously Unrecognized Class of Endogenous Bioactive Lipids Exhibiting a Cell Growth Inhibitory Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(9), 5654-5666. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02058>
- Bauermeister, A., Mannocho-Russo, H., Costa-Lotufo, L. V., Jarmusch, A. K., & Dorrestein, P. C. (2022). Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome investigations. *Nature reviews. Microbiology*, 20(3), 143-160. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00621-9>
- Becerra-Castro, C., Macedo, G., Silva, A. M. T., Manaia, C. M., & Nunes, O. C. (2016). Proteobacteria become predominant during regrowth after water disinfection. *The Science of the Total Environment*, 573, 313-323. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.054>
- Berr, C., Vercambre, M. N., Bonenfant, S., Singh Manoux, A., Zins, M., & Goldberg, M. (2010). Occupational exposure to solvents and cognitive performance in the GAZEL cohort: Preliminary results. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 30(1), 12-19. <https://doi.org/10.1159/000315498>

- Bessarab, I., Maszenan, A. M., Haryono, M. A. S., Arumugam, K., Saw, N. M. M. T., Seviour, R. J., & Williams, R. B. H. (2022). Comparative Genomics of Members of the Genus *Defluviicoccus* With Insights Into Their Ecophysiological Importance. *Frontiers in Microbiology*, 13, 834906. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.834906>
- Bharti, R., & Grimm, D. G. (2021). Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Briefings in Bioinformatics*, 22(1), 178-193. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz155>
- Bian, X. Y., Mbadinga, S. M., Liu, Y. F., Yang, S. Z., Liu, J. F., Ye, R. Q., Gu, J. D., & Mu, B. Z. (2015). Insights into the anaerobic biodegradation pathway of n-Alkanes in oil reservoirs by detection of signature metabolites. *Scientific Reports*, 5(April 2014), 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep09801>
- Bikle, D. D. (2012). Vitamin D and the skin: Physiology and pathophysiology. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 13(1), 3-19. <https://doi.org/10.1007/s11154-011-9194-0>
- Bikle, D. D. (2020). Vitamin D: Newer Concepts of Its Metabolism and Function at the Basic and Clinical Level. *Journal of the Endocrine Society*, 4(2), bvz038. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvz038>
- Bjerre, R. D., Hugerth, L. W., Boulund, F., Seifert, M., Johansen, J. D., & Engstrand, L. (2019). Effects of sampling strategy and DNA extraction on human skin microbiome investigations. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53599-z>
- Bocheva, G., Slominski, R. M., & Slominski, A. T. (2021). The Impact of Vitamin D on Skin Aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9097. <https://doi.org/10.3390/ijms22169097>
- Bogan, B. W., Sullivan, W. R., Kayser, K. J., Derr, K. D., Aldrich, H. C., & Paterek, J. R. (2003). *Alkanindiges illinoisensis* gen. Nov., sp. Nov., an obligately hydrocarbonoclastic, aerobic squalane-degrading bacterium isolated from oilfield soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(Pt 5), 1389-1395. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02568-0>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bopp, S. K., & Lettieri, T. (2007). Gene regulation in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Gene*, 396(2), 293-302. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.03.013>
- Boström, C. E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Törnqvist, M., Victorin, K., & Westerholm, R. (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environmental Health Perspectives*, 110(SUPPL. 3), 451-488. <https://doi.org/10.1289/ehp.110-1241197>
- Bouslimani, A., Da Silva, R., Kosciulek, T., Janssen, S., Callewaert, C., Amir, A., Dorrestein, K., Melnik, A. V., Zaramela, L. S., Kim, J. N., Humphrey, G., Schwartz, T., Sanders, K., Brennan, C., Luzzatto-Knaan, T., Ackermann, G., McDonald, D., Zengler, K., Knight, R., & Dorrestein, P. C. (2019). The impact of skin care products on skin chemistry and microbiome dynamics. *BMC Biology*, 17(1), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0660-6>
- Bouslimani, A., Porto, C., Rath, C. M., Wang, M., Guo, Y., Gonzalez, A., Berg-Lyon, D., Ackermann, G., Christensen, G. J. M., 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 of the United States of America*, 112(17), E2120-E2129. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424409112>

- Boxberger, M., Ben Khedher, M., Magnien, S., Cassir, N., & La Scola, B. (2021). Draft genome and description of *Microvirga mediterraneensis* strain Marseille-Q2068T sp. Nov., a new bacterium isolated from human healthy skin. *New Microbes and New Infections*, 40, 100839. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2021.100839>
- Brooijmans, R. J. W., Pastink, M. I., & Siezen, R. J. (2009). Hydrocarbon-degrading bacteria: The oil-spill clean-up crew. *Microbial Biotechnology*, 2(6), 587-594. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00151.x>
- Brown, K., Church, D., Lynch, T., & Gregson, D. (2014). Bloodstream infections due to *Peptoniphilus* spp.: Report of 15 cases. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(11), O857-860. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12657>
- Brown, K. W., & Armstrong, T. J. (2021). Hydrocarbon Inhalation. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470289/>
- Brown, L. M., Gunasekera, T. S., & Ruiz, O. N. (2017). Draft Genome Sequence of *Nocardioides luteus* Strain BAFB, an Alkane-Degrading Bacterium Isolated from JP-7-Polluted Soil. *Genome Announcements*, 5(4), e01529-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01529-16>
- Buermans, H. P. J., & den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1932-1941. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>
- Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., & Zemskaia, T. I. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
- Burke, R. C., Lee, T. H., & Buettner-Janusch, V. (1966). Free amino acids and water soluble peptides in stratum corneum and skin surface film in human beings. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 38(4), 355-373. [Archivo PDF]
- Burow, L. C., Kong, Y., Nielsen, J. L., Blackall, L. L., & Nielsen, P. H. (2007). Abundance and ecophysiology of *Defluviococcus* spp., glycogen-accumulating organisms in full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 1), 178-185. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/001032-0>
- Bushnell, B., Rood, J., & Singer, E. (2017). BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLOS ONE*, 12(10), e0185056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185056>
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 143-155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

- 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), 3718. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23986-0>
- Caporaso, J. G., Bittinger, K., Bushman, F. D., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., & Knight, R. (2010). PyNAST: A flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*, 26(2), 266-267. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp636>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, 6(8), 1621-1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Cappello, S., Volta, A., Santisi, S., Morici, C., Mancini, G., Quatrini, P., Genovese, M., Yakimov, M. M., & Torregrossa, M. (2016). Oil-degrading bacteria from a membrane bioreactor (BF-MBR) system for treatment of saline oily waste: Isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110, 235-244. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.028>
- Caputo, A., Fournier, P.-E., & Raoult, D. (2019). Genome and pan-genome analysis to classify emerging bacteria. *Biology Direct*, 14(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13062-019-0234-0>
- Caputo, A., Lagier, J.-C., Azza, S., Robert, C., Mouelhi, D., Fournier, P.-E., & Raoult, D. (2016). *Microvirga massiliensis* sp. Nov., the human commensal with the largest genome. *MicrobiologyOpen*, 5(2), 307-322. <https://doi.org/10.1002/mbo3.329>
- Cashman, M. W., & Sloan, S. B. (2010). Nutrition and nail disease. *Clinics in Dermatology*, 28(4), 420-425. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2010.03.037>
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330-339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>
- Chattopadhyay, S., Arnold, J. D., Malayil, L., Hittle, L., Mongodin, E. F., Marathe, K. S., Gomez-Lobo, V., & Sapkota, A. R. (2021). Potential role of the skin and gut microbiota in premenarchal vulvar lichen sclerosis: A pilot case-control study. *PloS One*, 16(1), e0245243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245243>
- Chen, L., Cai, Y., Zhou, G., Shi, X., Su, J., Chen, G., & Lin, K. (2014). Rapid Sanger Sequencing of the 16S rRNA Gene for Identification of Some Common Pathogens. *PLoS ONE*, 9(2), e88886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088886>
- Chen, T., Wang, J., & Mao, Z. (2023). Lipid Differences and Related Metabolism Present on the Hand Skin Surface of Different-Aged Asiatic Females—An Untargeted Metabolomics Study. *Metabolites*, 13(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/metabo13040553>

- Chen, T., Zhao, M., & Mao, Z. (2023). Lipidomic Analysis of Hand Skin Surface Lipids Reveals Smoking-Related Skin Changes. *Metabolites*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/metabo13020254>
- Chen, W.-M., Chen, W.-T., Young, C.-C., & Sheu, S.-Y. (2019). *Rheinheimera riviphila* sp. Nov., isolated from a freshwater stream. *Archives of Microbiology*, 201(7), 919-926. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01657-5>
- Chen, Y. E., Fischbach, M. A., & Belkaid, Y. (2018). Skin microbiota-host interactions. *Nature*, 553(7689), 427-436. <https://doi.org/10.1038/nature25177>
- Christensen, G. J. M., & Brüggemann, H. (2014). *Bacterial skin commensals and their role as host guardians*. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0062>
- Cogen, A. L., Nizet, V., & Gallo, R. L. (2008). Skin microbiota: A source of disease or defence? *British Journal of Dermatology*, 158(3), 442-455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x>
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M., & Tiedje, J. M. (2009). The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), D141-D145. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn879>
- Collins, M. D., Cockcroft, S., & Wallbanks, S. (1994). Phylogenetic analysis of a new LL-diaminopimelic acid-containing coryneform bacterium from herbage, *Nocardioides plantarum* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3), 523-526. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-523>
- Cornforth, D. M., & Foster, K. R. (2015). Antibiotics and the art of bacterial war. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(35), 10827-10828. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513608112>
- Cosseau, C., Romano-Bertrand, S., Duplan, H., Lucas, O., Ingrassia, I., Pigasse, C., Roques, C., & Jumas-Bilak, E. (2016). Proteobacteria from the human skin microbiota: Species-level diversity and hypotheses. *One Health (Amsterdam, Netherlands)*, 2, 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2016.02.002>
- Cossette, C., Patel, P., Anumolu, J. R., Sivendran, S., Lee, G. J., Gravel, S., Graham, F. D., Lesimple, A., Mamer, O. A., Rokach, J., & Powell, W. S. (2008). *Human Neutrophils Convert the Sebum-derived Polyunsaturated Fatty Acid Sebaleic Acid to a Potent Granulocyte Chemoattractant* *. 283(17), 11234-11243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709531200>
- Costa, F. G., & Horswill, A. R. (2022). Overcoming pH defenses on the skin to establish infections. *PLoS Pathogens*, 18(5), e1010512. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010512>
- da Silva Júnior, W. F., de Oliveira Pinheiro, J. G., Moreira, C. D. L. F. A., de Souza, F. J. J., & de Lima, Á. A. N. (2017). Chapter 15—Alternative Technologies to Improve Solubility and Stability of Poorly Water-Soluble Drugs. En A. M. Grumezescu (Ed.), *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics* (pp. 281-305). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52725-5.00015-0>
- da Silva, R. R., Wang, M., Nothias, L. F., van der Hooft, J. J. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Fox, E., Balunas, M. J., Klassen, J. L., Lopes, N. P., & Dorrestein, P. C. (2018). Propagating annotations of molecular networks using in silico fragmentation. *PLoS Computational Biology*, 14(4), 1-26. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006089>

- Dake, M. (2015). Biodegradable Polymers: Renewable Nature, Life Cycle, and Applications. En V. C. Kalia (Ed.), *Microbial Factories: Biodiversity, Biopolymers, Bioactive Molecules: Volume 2* (pp. 29-56). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2595-9_3
- Dalvie, D. K., Kalgutkar, A. S., Khojasteh-Bakht, S. C., Obach, R. S., & O'Donnell, J. P. (2002). Biotransformation Reactions of Five-Membered Aromatic Heterocyclic Rings. *Chemical Research in Toxicology*, 15(3), 269-299. <https://doi.org/10.1021/tx015574b>
- Daneshvar, M. I., Hollis, D. G., Weyant, R. S., Steigerwalt, A. G., Whitney, A. M., Douglas, M. P., Macgregor, J. P., Jordan, J. G., Mayer, L. W., Rassouli, S. M., Barchet, W., Munro, C., Shuttleworth, L., & Bernard, K. (2003). *Paracoccus yeeii* sp. Nov. (Formerly CDC group EO-2), a novel bacterial species associated with human infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), 1289-1294. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1289-1294.2003>
- Dekio, I., Sakamoto, M., Hayashi, H., Amagai, M., Suematsu, M., & Benno, Y. (2007). Characterization of skin microbiota in patients with atopic dermatitis and in normal subjects using 16S rRNA gene-based comprehensive analysis. *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 12), 1675-1683. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47268-0>
- Dembicki, Jr., H. (2017). Introduction. En *Practical Petroleum Geochemistry for Exploration and Production* (pp. 1-17). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803350-0.00001-5>
- Denner, E. B. M., Kolari, M., Hoornstra, D., Tsitko, I., Kämpfer, P., Busse, H.-J., & Salkinoja-Salonen, M. (2006). *Rubellimicrobium thermophilum* gen. Nov., sp. Nov., a red-pigmented, moderately thermophilic bacterium isolated from coloured slime deposits in paper machines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(6), 1355-1362. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63751-0>
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5069-5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- DeSantis, T. Z., Jr, Hugenholtz, P., Keller, K., Brodie, E. L., Larsen, N., Piceno, Y. M., Phan, R., & Andersen, G. L. (2006). NAST: A multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl_2), W394-W399. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl244>
- Ding, W., Hu, Y., Yu, X., He, C., & Tian, Y. (2022). Analysis on the difference of skin surface lipids during blue light therapy for acne by lipidomics. *Biomedical Optics Express*, 13(6), 3434-3445. <https://doi.org/10.1364/BOE.452614>
- Djemiel, C., Maron, P.-A., Terrat, S., Dequiedt, S., Cottin, A., & Ranjard, L. (2022). Inferring microbiota functions from taxonomic genes: A review. *GigaScience*, 11, giab090. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab090>
- Djombou Feunang, Y., 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(1), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0174-y>

- Donato, P., Dugo, P., & Mondello, L. (2023). Chapter 5—Separation of lipids. En S. Fanali, B. Chankvetadze, P. R. Haddad, C. F. Poole, & M.-L. Riekkola (Eds.), *Liquid Chromatography* (3.^a ed., Vol. 2, pp. 181-221). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99969-4.00011-5>
- Doyle, C., Costa Blasco, M., MacEneaney, O., Ryan, C., & Ní Raghallaigh, S. (2023). Disseminated cutaneous nocardia. *International Journal of Dermatology*, 62(1), e29-e31. <https://doi.org/10.1111/ijd.16402>
- Du, J., Mehler, W. T., Lydy, M. J., & You, J. (2012). Toxicity of sediment-associated unresolved complex mixture and its impact on bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, 203-204, 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.11.099>
- 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>
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Edgar, R. C. (2016). *UNOISE2: Improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing* (p. 081257). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/081257>
- Edgar, R. C., & Flyvbjerg, H. (2015). Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics*, 31(21), 3476-3482. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv401>
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194-2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Egert, M., Schmidt, I., Höhne, H.-M., Lachnit, T., Schmitz, R. A., & Breves, R. (2011). rRNA-based profiling of bacteria in the axilla of healthy males suggests right-left asymmetry in bacterial activity. *FEMS Microbiology Ecology*, 77(1), 146-153. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01097.x>
- Eisenstein, M. (2020). The skin microbiome. *Nature*, 588(7838), S209. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-03523-7>
- Emmert, H., Baurecht, H., Thielking, F., Stölzl, D., Rodriguez, E., Harder, I., Proksch, E., & Weidinger, S. (2021). Stratum corneum lipidomics analysis reveals altered ceramide profile in atopic dermatitis patients across body sites with correlated changes in skin microbiome. *Experimental Dermatology*, 30(10), 1398-1408. <https://doi.org/10.1111/exd.14185>

- Eneh, O. C. (2011). A Review on Petroleum: Source, Uses, Processing, Products and the Environment. *Journal of Applied Sciences*, 11(12), 2084-2091. <https://doi.org/10.3923/jas.2011.2084.2091>
- Eren, A. M., Morrison, H. G., Lescault, P. J., Reveillaud, J., Vineis, J. H., & Sogin, M. L. (2015). Minimum entropy decomposition: Unsupervised oligotyping for sensitive partitioning of high-throughput marker gene sequences. *The ISME Journal*, 9(4), 968-979. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.195>
- Ernst, M., Kang, K. B., Caraballo-Rodríguez, A. M., Nothias, L. F., Wandy, J., Chen, C., Wang, M., Rogers, S., Medema, M. H., Dorrestein, P. C., & van der Hooft, J. J. J. (2019). Molnetenhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. *Metabolites*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/metabo9070144>
- Eshak, G. A. (2012). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Role of Apoptosis in Dermatotoxic and Carcinogenic Effect in Asphalt Road Paving Workers. *Journal of Clinical Toxicology*, 02(06). <https://doi.org/10.4172/2161-0495.1000137>
- Evans, C. A., Mattern, K. L., & Hallam, S. L. (1978). Isolation and identification of *Peptococcus saccharolyticus* from human skin. *Journal of Clinical Microbiology*, 7(3), 261-264. <https://doi.org/10.1128/jcm.7.3.261-264.1978>
- Ewa, B., & Danuta, M.-Š. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *Journal of Applied Genetics*, 58(3), 321-330. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0380-3>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L., & Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 46(5), 839-861. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R. H., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M. J. O., & Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl(Suppl), S9-14. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>
- Fantini, J., & Yahi, N. (2015). Chapter 1—Chemical Basis of Lipid Biochemistry. En J. Fantini & N. Yahi (Eds.), *Brain Lipids in Synaptic Function and Neurological Disease* (pp. 1-28). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800111-0.00001-1>
- Farris, P. K. (2018). Chapter 5—Topical Skin Care and the Cosmetic Patient. En B. Azzadeh, M. R. Murphy, C. M. Johnson, G. G. Massry, & R. Fitzgerald (Eds.), *Master Techniques in Facial Rejuvenation* (2.^a ed., pp. 68-72.e2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35876-7.00005-4>
- Fayolle, F., Vandecasteele, J.-P., & Monot, F. (2001). Microbial degradation and fate in the environment of methyl tert-butyl ether and related fuel oxygenates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3), Article 3. <https://doi.org/10.1007/s002530100647>
- Ferraz, E. R. A., de Oliveira, G. A. R. de, & de Oliveira, D. P. de. (2012). The impact of aromatic amines on the environment: Risks and damages. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 4(3), 914-923. <https://doi.org/10.2741/e429>

- Fischler, M. A., & Bolles, R. C. (1981). Random sample consensus: A paradigm for model fitting with applications to image analysis and automated cartography. *Communications of the ACM*, 24(6), 381-395. <https://doi.org/10.1145/358669.358692>
- Flament, F., Bourokba, N., Nouveau, S., Li, J., & Charbonneau, A. (2018). A severe chronic outdoor urban pollution alters some facial aging signs in Chinese women. A tale of two cities. *International Journal of Cosmetic Science*, 40(5), 467-481. <https://doi.org/10.1111/ics.12487>
- Fogel, G. B., Collins, C. R., Li, J., & Brunk, C. F. (1999). Prokaryotic Genome Size and SSU rDNA Copy Number: Estimation of Microbial Relative Abundance from a Mixed Population. *Microbial Ecology*, 38(2), 93-113. <https://doi.org/10.1007/s002489900162>
- Fore, J. (2006). A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy/Wound Management*, 52(9), 24-27. <https://www.hmpgloballearningnetwork.com/site/wmp/content/a-review-skin-and-effects-aging-skin-structure-and-function>
- Fredricks, D. N. (2001). Microbial Ecology of Human Skin in Health and Disease. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 6(3), 167-169. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00039.x>
- Freinkel, R. K., Strauss, J. S., Yip, S. Y., & Pochi, P. E. (1965). Effect of Tetracycline on the Composition of Sebum in Acne Vulgaris. *New England Journal of Medicine*, 273(16), 850-854. <https://doi.org/10.1056/NEJM196510142731604>
- Freinkel, R. K., & Woodley, D. T. (2001). The biology of the skin. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95(2), 109. [Archivo PDF]
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23), 3150-3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>
- Funhoff, E. G., Bauer, U., García-Rubio, I., Witholt, B., & van Beilen, J. B. (2006). CYP153A6, a Soluble P450 Oxygenase Catalyzing Terminal-Alkane Hydroxylation. *Journal of Bacteriology*, 188(14), 5220-5227. <https://doi.org/10.1128/jb.00286-06>
- Funke, G., Frodl, R., & Sommer, H. (2004). First comprehensively documented case of Paracoccus yeei infection in a human. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 3366-3368. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3366-3368.2004>
- Fyhrquist, N., Muirhead, G., Prast-Nielsen, S., Jeanmougin, M., Olah, P., Skoog, T., Jules-Clement, G., Feld, M., Barrientos-Somarribas, M., Sinkko, H., van den Bogaard, E. H., Zeeuwen, P. L. J. M., Rikken, G., Schalkwijk, J., Niehues, H., Däubener, W., Eller, S. K., Alexander, H., Pennino, D., ... Alenius, H. (2019). Microbe-host interplay in atopic dermatitis and psoriasis. *Nature Communications*, 10(1), 4703. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12253-y>
- Gallo, R. L. (2017). Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(6), 1213-1214. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.045>
- Gao, H., Zhou, L., Cai, S., Zhang, G., Zhu, T., Gu, Q., & Li, D. (2013). Diorcinols B-E, new prenylated diphenyl ethers from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* ZLN-60. *The Journal of Antibiotics*, 66(9), 539-542. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.40>

- Gao, P., da Silva, E., Hou, L., Denslow, N. D., Xiang, P., & Ma, L. Q. (2018). Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolomics perspective. *Environment International*, 119(May), 466-477. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.017>
- Gao, Y., Yuan, L., Du, J., Wang, H., Yang, X., Duan, L., Zheng, L., Bahar, M. M., Zhao, Q., Zhang, W., Liu, Y., Fu, Z., Wang, W., & Naidu, R. (2022). Bacterial community profile of the crude oil-contaminated saline soil in the Yellow River Delta Natural Reserve, China. *Chemosphere*, 289, 133207. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133207>
- Gao, Z., Tseng, C., Pei, Z., & Blaser, M. J. (2007). Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8), 2927-2932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607077104>
- Gaspar, J. M. (2018). NGmerge: Merging paired-end reads via novel empirically-derived models of sequencing errors. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 536. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2579-2>
- Gharibzahedi, S. M. T., Razavi, S. H., & Mousavi, S. M. (2014). Characterization of bacteria of the genus *Dietzia*: An updated review. *Annals of Microbiology*, 64(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0603-3>
- Ghodsi, M., Liu, B., & Pop, M. (2011). DNACLUST: Accurate and efficient clustering of phylogenetic marker genes. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 271. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-271>
- Gillbro, J. M., Marles, L. K., Hibberts, N. A., & Schallreuter, K. U. (2004). Autocrine catecholamine biosynthesis and the beta-adrenoceptor signal promote pigmentation in human epidermal melanocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 123(2), 346-353. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23210.x>
- Girgis, H. Z. (2022). MeShClust v3.0: High-quality clustering of DNA sequences using the mean shift algorithm and alignment-free identity scores. *BMC Genomics*, 23(1), 423. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08619-0>
- Gobbetti, M., & Rizzello, C. G. (2014). *Arthrobacter*. En C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (2.^a ed., pp. 69-76). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00009-4>
- Gontcharova, V., Youn, E., Sun, Y., Wolcott, R. D., & Dowd, S. E. (2010). A comparison of bacterial composition in diabetic ulcers and contralateral intact skin. *The Open Microbiology Journal*, 4, 8-19. <https://doi.org/10.2174/1874285801004010008>
- Guimberteau, J. C., Delage, J. P., McGrouther, D. A., & Wong, J. K. F. (2010). The microvacuolar system: How connective tissue sliding works. *Journal of Hand Surgery (European Volume)*, 35(8), 614-622. <https://doi.org/10.1177/1753193410374412>
- Hachem, J.-P., Crumrine, D., Fluhr, J., Brown, B. E., Feingold, K. R., & Elias, P. M. (2003). pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *The Journal of Investigative Dermatology*, 121(2), 345-353. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12365.x>

- Han, J.-R., Li, S., Lu, C.-Y., Lian, W.-H., Shi, G.-Y., Feng, C.-Y., Li, W.-J., & Dong, L. (2023). *Rubellimicrobium arenae* sp. Nov., isolated from desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(7), 005990. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005990>
- Hanson, J., Gille, A., Zwykiel, S., Lukasova, M., Clausen, B. E., Ahmed, K., Tunaru, S., Wirth, A., & Offermanns, S. (2010). *Nicotinic acid- and monomethyl fumarate-induced flushing involves GPR109A expressed by keratinocytes and COX-2-dependent prostanoid formation in mice*. <https://doi.org/10.1172/JCI42273>
- Harwood, A. D., Landrum, P. F., & Lydy, M. J. (2013). Bioavailability-based toxicity endpoints of bifenthrin for *Hyaella azteca* and *Chironomus dilutus*. *Chemosphere*, 90(3), 1117-1122. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.017>
- Head, S. R., Komori, H. K., LaMere, S. A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D. R., & Ordoukhanian, P. (2014). Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *BioTechniques*, 56(2), 61-passim. <https://doi.org/10.2144/000114133>
- Hemmersbach-Miller, M., Stout, J. E., Woodworth, M. H., Cox, G. M., & Saullo, J. L. (2018). *Nocardia* infections in the transplanted host. *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society*, 20(4), e12902. <https://doi.org/10.1111/tid.12902>
- Hewison, M. (s. f.). Vitamin D and immune function: An overview | Proceedings of the Nutrition Society. Cambridge Core. <https://doi.org/10.1017/S0029665111001650>
- Holman, J. D., Tabb, D. L., & Mallick, P. (2014). Employing ProteoWizard to convert raw mass spectrometry data. *Current Protocols in Bioinformatics*, SUPPL.46, 1-9. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1324s46>
- Honari, G., & Maibach, H. (2014). Chapter 1—Skin Structure and Function. En H. Maibach & G. Honari (Eds.), *Applied Dermatotoxicology* (pp. 1-10). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420130-9.00001-3>
- Hu, X., Li, H., Zhao, X., Zhou, R., Liu, H., Sun, Y., Fan, Y., Shi, Y., Qiao, S., Liu, S., Liu, H., & Zhang, S. (2021). Multi-omics study reveals that statin therapy is associated with restoration of gut microbiota homeostasis and improvement in outcomes in patients with acute coronary syndrome. *Theranostics*, 11(12), 5778-5793. <https://doi.org/10.7150/thno.55946>
- Huse, S. M., Welch, D. M., Morrison, H. G., & Sogin, M. L. (2010). Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environmental Microbiology*, 12(7), 1889-1898. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02193.x>
- Iakovides, M., Tsiamis, G., Tziaras, T., Stathopoulou, P., Nikolaki, S., Iakovides, G., & Stephanou, E. G. (2022). Two-year systematic investigation reveals alterations induced on chemical and bacteriome profile of PM2.5 by African dust incursions to the Mediterranean atmosphere. *Science of The Total Environment*, 815, 151976. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151976>
- Illumina Inc. (2013, noviembre 21). *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*. Illumina Inc: San Diego, CA, USA. https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf

- Jacques, R. J. S., Okeke, B. C., Bento, F. M., Peralba, M. C. R., & Camargo, F. A. O. (2007). Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. *Bioremediation Journal*, 11(1), 1-11. <https://doi.org/10.1080/10889860601185822>
- Jarmusch, A. K., Elijah, E. O., Vargas, F., Bouslimani, A., Da Silva, R. R., Ernst, M., Wang, M., Del Rosario, K. K., Dorrestein, P. C., & Tsunoda, S. M. (2019). Initial Development toward Non-Invasive Drug Monitoring via Untargeted Mass Spectrometric Analysis of Human Skin [Research-article]. *Analytical Chemistry*, 91(13), 8062-8069. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05854>
- Jiang, R., Li, W. V., & Li, J. J. (2021). mblImpute: An accurate and robust imputation method for microbiome data. *Genome Biology*, 22(1), 192. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02400-4>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Jones, A. L., Koerner, R. J., Natarajan, S., Perry, J. D., & Goodfellow, M. (2008). *Dietzia papillomatosis* sp. Nov., a novel actinomycete isolated from the skin of an immunocompetent patient with confluent and reticulated papillomatosis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(Pt 1), 68-72. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65178-0>
- Joura, M. I., Brunner, A., Nemes-Nikodém, É., Sárdy, M., & Ostorházi, E. (2021). Interactions between immune system and the microbiome of skin, blood and gut in pathogenesis of rosacea. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica*, 68(1), 1-6. <https://doi.org/10.1556/030.2021.01366>
- Jünemann, S., Kleinbölting, N., Jaenicke, S., Henke, C., Hassa, J., Nelkner, J., Stolze, Y., Albaum, S. P., Schlüter, A., Goesmann, A., Sczyrba, A., & Stoye, J. (2017). Bioinformatics for NGS-based metagenomics and the application to biogas research. *Journal of Biotechnology*, 261, 10-23. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.08.012>
- Jung, C. M., Broberg, C., Giuliani, J., Kirk, L. L., & Hanne, L. F. (2002). Characterization of JP-7 jet fuel degradation by the bacterium *Nocardioides luteus* strain BAFB. *Journal of Basic Microbiology*, 42(2), 127-131. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200205\)42:2<127::AID-JOBM127>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200205)42:2<127::AID-JOBM127>3.0.CO;2-C)
- Jung, E. S., Park, J. il, Park, H., Holzapfel, W., Hwang, J. S., & Lee, C. H. (2019). Seven-day Green Tea Supplementation Revamps Gut Microbiome and Caecum/Skin Metabolome in Mice from Stress. *Scientific Reports*, 9(1), 18418. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54808-5>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kang, S., Amagai, M., Bruckner, A. L., Enk, A., Margolis, D. J., McMichael, A. J., & Orringer, J. S. (Eds.). (2019). *Fitzpatrick's dermatology* (9.^a ed.). McGraw Hill Education. <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2570§ionid=210413306>
- Karlic, H., & Varga, F. (2019). Mevalonate Pathway. En P. Boffetta & P. Hainaut (Eds.), *Encyclopedia of Cancer* (3.^a ed., pp. 445-457). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65000-6>

- Karlson, U., Dwyer, D. F., Hooper, S. W., Moore, E. R., Timmis, K. N., & Eltis, L. D. (1993). Two independently regulated cytochromes P-450 in a *Rhodococcus rhodochrous* strain that degrades 2-ethoxyphenol and 4-methoxybenzoate. *Journal of Bacteriology*, 175(5), 1467-1474. <https://doi.org/10.1128/jb.175.5.1467-1474.1993>
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., & Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: Improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33(2), 511-518. <https://doi.org/10.1093/nar/gki198>
- Keikha, M. (2018). *Williamsia* spp. Are emerging opportunistic bacteria. *New Microbes and New Infections*, 21, 88-89. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.11.002>
- Kemper, J. M., Walse, S. S., & Mitch, W. A. (2010). Quaternary amines as nitrosamine precursors: A role for consumer products? *Environmental Science & Technology*, 44(4), 1224-1231. <https://doi.org/10.1021/es902840h>
- Kenny, S. T., Runic, J. N., Kaminsky, W., Woods, T., Babu, R. P., Keely, C. M., Blau, W., & O'Connor, K. E. (2008). Up-Cycling of PET (Polyethylene Terephthalate) to the Biodegradable Plastic PHA (Polyhydroxyalkanoate). *Environmental Science & Technology*, 42(20), 7696-7701. <https://doi.org/10.1021/es801010e>
- Kežić, S., Krüse, J., Jakaša, I., Boogaard, P. J., & Minsavage, G. D. (2010). *Review of dermal effects and uptake of petroleum hydrocarbons. Report no. 5/10.* <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:135115457>
- Khalid, M., & Abdollahi, M. (2021). Environmental Distribution of Personal Care Products and Their Effects on Human Health. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 20(1), 216-253. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2021.114891.15088>
- Khanna, S., & Gharpure, A. S. (2017). Petroleum Carcinogenicity and Aerodigestive Tract: In Context of Developing Nations. *Cureus*, 9(4). <https://doi.org/10.7759/cureus.1202>
- 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, Y.-H., & Engesser, K.-H. (2004). Degradation of Alkyl Ethers, Aralkyl Ethers, and Dibenzyl Ether by *Rhodococcus* sp. Strain DEE5151, Isolated from Diethyl Ether-Containing Enrichment Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4398-4401. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4398-4401.2004>
- Kishimoto, S., Sato, M., Tsunematsu, Y., & Watanabe, K. (2016). Evaluation of Biosynthetic Pathway and Engineered Biosynthesis of Alkaloids. *Molecules*, 21(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/molecules21081078>
- Klapper, M., Götze, S., Barnett, R., Willing, K., & Stallforth, P. (2016). Bacterial Alkaloids Prevent Amoebal Predation. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(31), 8944-8947. <https://doi.org/10.1002/anie.201603312>

- Klein, A. N., Frigon, D., & Raskin, L. (2007). Populations related to *Alkanindiges*, a novel genus containing obligate alkane degraders, are implicated in biological foaming in activated sludge systems. *Environmental Microbiology*, 9(8), 1898-1912. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01307.x>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Koerner, R. J., Goodfellow, M., & Jones, A. L. (2009). The genus *Dietzia*: A new home for some known and emerging opportunist pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 55(3), 296-305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00513.x>
- Kong, H. H., & Segre, J. A. (2012). Skin Microbiome: Looking Back to Move Forward. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), 933-939. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.417>
- Korinth, G., Weiss, T., Angerer, J., & Drexler, H. (2006). Dermal absorption of aromatic amines in workers with different skin lesions: A report on 4 cases. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology (London, England)*, 1, 17. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-1-17>
- Kubota, M., Kawahara, K., Sekiya, K., Uchida, T., Hattori, Y., Futamata, H., & Hiraishi, A. (2005). *Nocardioides aromaticivorans* sp. Nov., a dibenzofuran-degrading bacterium isolated from dioxin-polluted environments. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(2), 165-174. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.10.002>
- Kuchly, B., Aucher, P., Violette, J., & Bourdiol, M. C. (2020). *Rheinheimera* bacteremia. *Medecine Et Maladies Infectieuses*, 50(4), 377-378. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.12.010>
- Kumar, A., Bajaj, A., Mathan Kumar, R., Kaur, G., Kaur, N., Kumar Singh, N., Manickam, N., & Mayilraj, S. (2015). Taxonomic description and genome sequence of *Rheinheimera mesophila* sp. Nov., isolated from an industrial waste site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(10), 3666-3673. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000471>
- Laczi, K., Erdeiné Kis, Á., Szilágyi, Á., Bounedjoum, N., Bodor, A., Vincze, G. E., Kovács, T., Rákhely, G., & Perei, K. (2020). New Frontiers of Anaerobic Hydrocarbon Biodegradation in the Multi-Omics Era. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.590049>
- Lagier, J.-C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., Bittar, F., Fournous, G., Gimenez, G., Maraninchi, M., Trape, J.-F., Koonin, E. V., La Scola, B., & Raoult, D. (2012). Microbial culturomics: Paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(12), 1185-1193. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12023>
- Lai, Y., Di Nardo, A., Nakatsuji, T., Leichtle, A., Yang, Y., Cogen, A. L., Wu, Z., Hooper, L. V., Schmidt, R. R., von Aulock, S., Radek, K. A., Huang, C., Ryan, A. F., & Gallo, R. L. (2009). Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nature Medicine*, 15(12), 1377-1382. <https://doi.org/10.1038/nm.2062>
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., & Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), 814-821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>

- Lawson, P. A., Collins, M. D., Schumann, P., Tindall, B. J., Hirsch, P., & Labrenz, M. (2000). New LL-diaminopimelic acid-containing actinomycetes from hypersaline, heliothermal and meromictic Antarctic Ekho Lake: *Nocardioides aquaticus* sp. nov. and *Friedmanniella* [correction of *Friedmanniella*] *lacustris* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 23(2), 219-229. [https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(00\)80008-9](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(00)80008-9)
- Lee, B., Moon, T., Yoon, S., & Weissman, T. (2017). DUDE-Seq: Fast, flexible, and robust denoising for targeted amplicon sequencing. *PLOS ONE*, 12(7), e0181463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181463>
- Lee, H. J., Jeong, S. E., Lee, S., Kim, S., Han, H., & Jeon, C. O. (2018). Effects of cosmetics on the skin microbiome of facial cheeks with different hydration levels. *MicrobiologyOpen*, 7(2), e00557. <https://doi.org/10.1002/mbo3.557>
- Lee, J. H., & Talaska, G. (1999). Effects of kerosene cleaning on the formation of dna adducts in the skin and lung tissues of mice dermally exposed to used gasoline engine oil. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 56(7), 463-470. <https://doi.org/10.1080/009841099157926>
- Leung, M. H. Y., Tong, X., Bastien, P., Guinot, F., Tenenhaus, A., Appenzeller, B. M. R., Betts, R. J., Mezzache, S., Li, J., Bourokba, N., Breton, L., Clavaud, C., & Lee, P. K. H. (2020). Changes of the human skin microbiota upon chronic exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants. *Microbiome*, 8(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00874-1>
- Leung, M. H. Y., Tong, X., Shen, Z., Du, S., Bastien, P., Appenzeller, B. M. R., Betts, R. J., Mezzache, S., Bourokba, N., Cavusoglu, N., Aguilar, L., Misra, N., Clavaud, C., & Lee, P. K. H. (2023). Skin microbiome differentiates into distinct cutotypes with unique metabolic functions upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Microbiome*, 11(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01564-4>
- Levin, S. A., Carpenter, S. R., Godfray, H. C. J., Kinzig, A. P., Loreau, M., Losos, J. B., Walker, B., & Wilcove, D. S. (Eds.). (2009). *The Princeton Guide to Ecology*. Princeton University Press. <https://doi.org/10.1515/9781400833023>
- Lewis, G. P., McMartin, C., Rosenthal, S. R., & Yates, C. (1972). Isolation and identification of pharmacologically active amino acids in skin and their structure-activity relationship on the guinea-pig ileum. *British Journal of Pharmacology*, 45(1), 104-117. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1972.tb09581.x>
- Leydcn, J. J., McGinley, K. J., Nordstrom, K. M., & Webster, G. F. (1987). Skin Microflora. *Journal of Investigative Dermatology*, 88(3, Supplement), 65-72. <https://doi.org/10.1038/jid.1987.13>
- Li, C., Cui, C., Zhang, J., Shen, J., He, B., Long, Y., & Ye, J. (2023). Biodegradation of petroleum hydrocarbons based pollutants in contaminated soil by exogenous effective microorganisms and indigenous microbiome. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 253, 114673. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114673>
- Li, F., Xiang, B., Jin, Y., Li, C., Ren, S., Wu, Y., Li, J., & Luo, Q. (2020). Hepatotoxic effects of inhalation exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons on lipid metabolism of C57BL/6 mice. *Environment International*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105000>

- Li, M. (2011). *DUK - A Fast and Efficient Kmer Based Sequence Matching Tool*. <https://escholarship.org/uc/item/5cb5810k>
- Li, Y.-J., Chuang, C.-H., Cheng, W.-C., Chen, S.-H., Chen, W.-L., Lin, Y.-J., Lin, C.-Y., & Shih, Y.-H. (2022). A metagenomics study of hexabromocyclododecane degradation with a soil microbial community. *Journal of Hazardous Materials*, 430, 128465. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128465>
- Li, Y.-L., Weng, J.-C., Hsiao, C.-C., Chou, M.-T., Tseng, C.-W., & Hung, J.-H. (2015). PEAT: An intelligent and efficient paired-end sequencing adapter trimming algorithm. *BMC Bioinformatics*, 16 Suppl 1(Suppl 1), S2. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-16-S1-S2>
- Liang, F., Lu, M., Keener, T. C., Liu, Z., & Khang, S. J. (2005). The organic composition of diesel particulate matter, diesel fuel and engine oil of a non-road diesel generator. *Journal of Environmental Monitoring*, 7(10), 983-988. <https://doi.org/10.1039/b504728e>
- Liu, X., Ge, W., Zhang, X., Chai, C., Wu, J., Xiang, D., & Chen, X. (2019). Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soil by *Paracoccus* sp. LXC combined with humic acid and spent mushroom substrate. *Journal of Hazardous Materials*, 379, 120820. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120820>
- Lotte, R., Chevalier, A., Dantas, S., Degand, N., Gaudart, A., Röhlich, P.-S., Boyer, L., Rodriguez-Nava, V., Del Giudice, P., & Ruimy, R. (2020). *Nocardia* takedensis: A newly recognized pathogen responsible for skin and soft tissue infections. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00379-7>
- Lozano, G. L., Park, H. B., Bravo, J. I., Armstrong, E. A., Denu, J. M., Stabb, E. V., Broderick, N. A., Crawford, J. M., & Handelsman, J. (2019). Bacterial Analogs of Plant Tetrahydropyridine Alkaloids Mediate Microbial Interactions in a Rhizosphere Model System. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(10), e03058-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.03058-18>
- Lu, Y., Zhou, G., Ewald, J., Pang, Z., Shiri, T., & Xia, J. (2023). MicrobiomeAnalyst 2.0: Comprehensive statistical, functional and integrative analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W310-W318. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad407>
- Luo, W., Verweij, R. A., & Van Gestel, C. A. M. (2014). Determining the bioavailability and toxicity of lead contamination to earthworms requires using a combination of physicochemical and biological methods. *Environmental Pollution*, 185, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.017>
- Lynch, S. A., & Schwarz, K. A. (2010). Chapter 83—Chemical Peeling and Dermabrasion. En J. Weinzwieg (Ed.), *Plastic Surgery Secrets Plus* (2.^a ed., pp. 549-553). Mosby. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-03470-8.00083-1>
- MacCrehan, W. A., & Brown-Thomas, J. M. (1987). Determination of phenols in petroleum crude oils using liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical Chemistry*, 59(3), 477-479. <https://doi.org/10.1021/ac00130a021>
- Maceo, A. V. (2017). Capítulo 2: Anatomía y Fisiología de la cresta de fricción en la piel adulta. En E. H. Holder, L. O. Robinson, & Laub (Eds.), *El libro de referencia de las huellas dactilares* (pp. 3-25). Departamento de Justicia de los Estados Unidos Oficina de Programas de Justicia. <https://www.ojp.gov/pdffiles1/nij/250973.pdf>

- MacLaughlin, J., & Holick, M. F. (1985). Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *Journal of Clinical Investigation*, 76(4), 1536-1538. <https://doi.org/10.1172/JCI112134>
- Magnusson, G., Nyberg, J.-A., Bodin, N.-O., & Hansson, E. (1972). Toxicity of pyrazole and 4-methylpyrazole in mice and rats. *Experientia*, 28(10), Article 10. <https://doi.org/10.1007/BF01946169>
- Malik, E., Dennison, S. R., Harris, F., & Phoenix, D. A. (2016). pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 9(4), 67. <https://doi.org/10.3390/ph9040067>
- Mamtimin, T., Han, H., Khan, A., Feng, P., Zhang, Q., Ma, X., Fang, Y., Liu, P., Kulshrestha, S., Shigaki, T., & Li, X. (2023). Gut microbiome of mealworms (*Tenebrio molitor* Larvae) show similar responses to polystyrene and corn straw diets. *Microbiome*, 11(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01550-w>
- Maran, M. I. J., & Davis G., D. J. (2022). Benefits of merging paired-end reads before pre-processing environmental metagenomics data. *Marine Genomics*, 61, 100914. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2021.100914>
- Marples, R. R., Downing, D. T., & Kligman, A. M. (1971). Control of Free Fatty Acids in Human Surface Lipids by *Corynebacterium Acnes*. *Journal of Investigative Dermatology*, 56(2), 127-131. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12260695>
- Martens, P.-J., Gysemans, C., Verstuyf, A., & Mathieu, C. (2020). Vitamin D's Effect on Immune Function. *Nutrients*, 12(5), 1248. <https://doi.org/10.3390/nu12051248>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Maszenan, A. M., Bessarab, I., Williams, R. B. H., Petrovski, S., & Seviour, R. J. (2022). The phylogeny, ecology and ecophysiology of the glycogen accumulating organism (GAO) *Defluviicoccus* in wastewater treatment plants. *Water Research*, 221, 118729. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118729>
- McIlroy, S., & Seviour, R. J. (2009). Elucidating further phylogenetic diversity among the *Defluviicoccus*-related glycogen-accumulating organisms in activated sludge. *Environmental Microbiology Reports*, 1(6), 563-568. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00082.x>
- McKee, R. H., & Plutnick, R. T. (1989). Carcinogenic potential of gasoline and diesel engine oils. *Toxicological Sciences*, 13(3), 545-553. <https://doi.org/10.1093/toxsci/13.3.545>
- McKee, R. H., & White, R. (2014). The Mammalian Toxicological Hazards of Petroleum-Derived Substances: An Overview of the Petroleum Industry Response to the High Production Volume Challenge Program. *International Journal of Toxicology*, 33(Supplement 1), 45-165. <https://doi.org/10.1177/1091581813514024>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

- Mehlman, M. A. (1991). Dangerous properties of petroleum refining products: Carcinogenicity of motor fuels (gasoline). *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.* 10:399–408, 1990: Author's reply. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 11(4), 220-226. <https://doi.org/10.1002/tcm.1770110407>
- Meyer-Baron, M., Blaszkewicz, M., Henke, H., Knapp, G., Muttray, A., Schäper, M., & van Thriel, C. (2008). The impact of solvent mixtures on neurobehavioral performance-Conclusions from epidemiological data. *NeuroToxicology*, 29(3), 349-360. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.02.005>
- Mikesh, L. M., Aramadhaka, L. R., Moskaluk, C., Zigrino, P., Mauch, C., & Fox, J. W. (2013). Proteomic anatomy of human skin. *Journal of Proteomics*, 84, 190-200. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.019>
- Min, D. B., & Wen, J. (1982). Gas chromatographic determination of biphenyl and phenyl ether in oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 59(7), 278-279. <https://doi.org/10.1007/BF02662224>
- Misra, N., Clavaud, C., Guinot, F., Bourokba, N., Nouveau, S., Mezzache, S., Palazzi, P., Appenzeller, B. M. R., Tenenhaus, A., Leung, M. H. Y., Lee, P. K. H., Bastien, P., Aguilar, L., & Cavusoglu, N. (2021). Multi-omics analysis to decipher the molecular link between chronic exposure to pollution and human skin dysfunction. *Scientific Reports*, 11(1), 18302. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97572-1>
- Mitura, S., Sionkowska, A., & Jaiswal, A. (2020). Biopolymers for hydrogels in cosmetics: Review. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 31(6), 50. <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06390-w>
- Modolo, L., & Lerat, E. (2015). UrQt: An efficient software for the Unsupervised Quality trimming of NGS data. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0546-8>
- 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), 4035. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06082-8>
- Mohler, R. E., Ahn, S., O'Reilly, K., Zemo, D. A., Espino Devine, C., Magaw, R., & Sihota, N. (2020). Towards comprehensive analysis of oxygen containing organic compounds in groundwater at a crude oil spill site using GC×GC-TOFMS and Orbitrap ESI-MS. *Chemosphere*, 244, 125504. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125504>
- Mohler, R. E., O'Reilly, K. T., Zemo, D. A., Tiwary, A. K., Magaw, R. I., & Synowiec, K. A. (2013). Non-Targeted Analysis of Petroleum Metabolites in Groundwater Using GC×GC-TOFMS. *Environmental Science & Technology*, 47(18), 10471-10476. <https://doi.org/10.1021/es401706m>
- Montagnolli, R. N., Lopes, P. R. M., & Bidoia, E. D. (2015). Screening the Toxicity and Biodegradability of Petroleum Hydrocarbons by a Rapid Colorimetric Method. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68(2), 342-353. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0112-9>
- Moreno-Ulloa, A., Sicairos Diaz, V., Tejeda-Mora, J. A., Macias Contreras, M. I., Castillo, F. D., Guerrero, A., Gonzalez Sanchez, R., Mendoza-Porras, O., Vazquez Duhalt, R., & Licea-Navarro, A. (2020).

- Chemical Profiling Provides Insights into the Metabolic Machinery of Hydrocarbon-Degrading Deep-Sea Microbes. *mSystems*, 5(6), 1-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00824-20>
- Mostafa, W. Z., & Hegazy, R. A. (2015). Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(6), 793-804. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.01.011>
- Msaddak, A., Rejili, M., Durán, D., Rey, L., Imperial, J., Palacios, J. M., Ruiz-Argüeso, T., & Mars, M. (2017). Members of Microvirga and Bradyrhizobium genera are native endosymbiotic bacteria nodulating *Lupinus luteus* in Northern Tunisian soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(6). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix068>
- Murdoch, D. A. (1998). Gram-positive anaerobic cocci. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 81-120. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.81>
- Murphy, E. C., & Frick, I.-M. (2013). Gram-positive anaerobic cocci—Commensals and opportunistic pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(4), 520-553. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12005>
- Myers, O. D., Sumner, S. J., Li, S., Barnes, S., & Du, X. (2017). One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. *Analytical Chemistry*, 89(17), 8696-8703. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00947>
- Mysara, M., Leys, N., Raes, J., & Monsieurs, P. (2016). IPED: A highly efficient denoising tool for Illumina MiSeq Paired-end 16S rRNA gene amplicon sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 192. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1061-2>
- Nabi, D., Katz, S., & Aeppli, C. (2017). Are oxygenated hydrocarbons important oil degradation products after oil spills? *International Oil Spill Conference Proceedings*, 2017(1), 571-588. <https://doi.org/10.7901/2169-3358-2017.1.571>
- Nakano, M., Omae, K., Takebayashi, T., Tanaka, S., & Koda, S. (2018). An epidemic of bladder cancer: Ten cases of bladder cancer in male Japanese workers exposed to ortho-toluidine. *Journal of Occupational Health*, 60(4), 307-311. <https://doi.org/10.1539/joh.2017-0220-OA>
- Nguyen, M. V., Han, J. W., Kim, H., & Choi, G. J. (2022). Phenyl Ethers from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus tabacinus* and Their Antimicrobial Activity Against Plant Pathogenic Fungi and Bacteria. *ACS Omega*, 7(37), 33273-33279. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03859>
- Nguyen, N.-P., Warnow, T., Pop, M., & White, B. (2016). A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.4>
- Ni, Y., Yu, G., Chen, H., Deng, Y., Wells, P., Steves, C., Ju, F., & Fu, J. (2019). M 2 IA: a Web Server for Microbiome and Metabolome Integrative Analysis. *MMCA: a Web-based Server for the Microbiome and Metabolome Correlation Analysis*, 2020, 678813. <https://doi.org/10.1101/678813>
- Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., & Larsson, K.-H. (2008). Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its

- Implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 4, 193-201. <https://doi.org/10.4137/EBO.S653>
- Obagi, S. (2018). 12—Lifetime Skincare. En J. Niamtu (Ed.), *Cosmetic Facial Surgery* (2.^a ed., pp. 656-667). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39393-5.00012-1>
- Obagi, S., & Gandhi, R. K. (2017). 85—Skin Rejuvenation and Resurfacing. En P. A. Brennan, H. Schliephake, G. E. Ghali, & L. Cascarini (Eds.), *Maxillofacial Surgery* (3.^a ed., pp. 1286-1301). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6056-4.00085-X>
- Offermanns, S. (2017). Hydroxy-Carboxylic Acid Receptor Actions in Metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(3), 227-236. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.11.007>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, B., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, H., & Wagner, H. (2015). Vegan: Community Ecology Package. *R Package Version 2.2-1*, 2, 1-2. <https://github.com/vegandevs/vegan>
- Olawoyin, R. O. (2012). Application of expert systems in the characterization and impact of petroleum derivatives on human health. *ProQuest Dissertations and Theses*, December. <http://search.proquest.com/docview/1355741493?accountid=11648>
- Oulas, A., Pavludi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G. A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., Arvanitidis, C., & Iliopoulos, I. (2015). Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. *Bioinformatics and Biology Insights*, 9, 75-88. <https://doi.org/10.4137/BBI.S12462>
- Paixão, J. F., Nascimento, I. A., Pereira, S. A., Leite, M. B. L., Carvalho, G. C., Silveira, J. S. C., Rebouças, M., Matias, G. R. A., & Rodrigues, I. L. P. (2007). Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: An approach to minimize environmental pollution risk. *Environmental Research*, 103(3), 365-374. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.06.015>
- Paliy, O., & Shankar, V. (2016). Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Molecular Ecology*, 25(5), 1032-1057. <https://doi.org/10.1111/mec.13536>
- Palmiotto, G., Pieraccini, G., Moneti, G., & Dolara, P. (2001). Determination of the levels of aromatic amines in indoor and outdoor air in Italy. *Chemosphere*, 43(3), 355-361. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(00\)00109-0](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(00)00109-0)
- Panda, A. N., Ray, L., Mishra, S. R., & Raina, V. (2020). *Rheinheimera pleomorphic* sp. Nov., a Novel Alkali-Tolerant Bacteria Isolated from Chilika Lake, India. *Current Microbiology*, 77(1), 158-165. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01802-9>
- Pang, Z., Zhou, G., Ewald, J., Chang, L., Hacariz, O., Basu, N., & Xia, J. (2022). Using MetaboAnalyst 5.0 for LC-HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nature Protocols*, 17(8), 1735-1761. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00710-w>
- Pareek, C. S., Smoczynski, R., & Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*, 52(4), 413-435. <https://doi.org/10.1007/s13353-011-0057-x>

- Park, K., Lee, S., & Lee, Y.-M. (2013). Sphingolipids and antimicrobial peptides: Function and roles in atopic dermatitis. *Biomolecules & Therapeutics*, 21(4), 251-257. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2013.058>
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. (2014). STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(21), 3123-3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- Parsons, J. B., & Rock, C. O. (2013). Bacterial lipids: Metabolism and membrane homeostasis. *Progress in Lipid Research*, 52(3), 249-276. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.02.002>
- Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Xue, Y., Fu, X.-Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.-S., & Yao, Q.-H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6), 927-955. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x>
- Petroleum Derivatives: Synthesis and Application. (2017). *6th International Conference on Petroleum Engineering*. <https://www.omicsonline.org/conferences-list/petroleum-derivatives-synthesis-and-application>
- Pham, D.-M., Boussouira, B., Moyal, D., & Nguyen, Q. I. (2015). Oxidization of squalene, a human skin lipid: A new and reliable marker of environmental pollution studies. *International Journal of Cosmetic Science*, 37(4), 357-365. <https://doi.org/10.1111/ics.12208>
- Pichler, M., Coskun, Ö. K., Ortega-Arbulú, A.-S., Conci, N., Wörheide, G., Vargas, S., & Orsi, W. D. (2018). A 16S rRNA gene sequencing and analysis protocol for the Illumina MiniSeq platform. *MicrobiologyOpen*, 7(6), e00611. <https://doi.org/10.1002/mbo3.611>
- Plewig, G., Melnik, B., & Chen, W. (2019). Pilosebaceous Follicles: Structure, Biochemistry, and Function. In *Plewig and Kligman's Acne and Rosacea* (pp. 1-34). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49274-2_1
- 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. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
- Potratz, S., Jungnickel, H., Grabiger, S., Tarnow, P., Otto, W., Fritsche, E., von Bergen, M., & Luch, A. (2016). Differential cellular metabolite alterations in HaCaT cells caused by exposure to the aryl hydrocarbon receptor-binding polycyclic aromatic hydrocarbons chrysene, benzo[a]pyrene and dibenzo[a,l]pyrene. *Toxicology Reports*, 3, 763-773. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.09.003>
- Prauser, H., Schumann, P., Rainey, F. A., Kroppenstedt, R. M., & Stackebrandt, E. (1997). *Terracoccus luteus* gen. Nov., sp. Nov., an LL-diaminopimelic acid-containing coccoid actinomycete from soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4), 1218-1224. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1218>
- Proctor, L. M. (2011). The human microbiome project in 2011 and beyond. *Cell Host and Microbe*, 10(4), 287-291. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.001>
- Prodan, A., Tremaroli, V., Brolin, H., Zwinderman, A. H., Nieuwdorp, M., & Levin, E. (2020). Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLOS ONE*, 15(1), e0227434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227434>

- Proksch, E. (2018). pH in nature, humans and skin. *The Journal of Dermatology*, 45(9), 1044-1052. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14489>
- Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J. M. (2008). The skin: An indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063-1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>
- Proksch, E., & Lachapelle, J.-M. (2005). The management of dry skin with topical emollients—Recent perspectives. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 3(10), 768-774. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2005.05068.x>
- Puri, P., Nandar, S. K., Kathuria, S., & Ramesh, V. (2017). Effects of air pollution on the skin: A review. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 83(4), 415-423. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.199579>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 590-596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2011). Removing Noise From Pyrosequenced Amplicons. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-38>
- Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa, F., Rongioletti, M. C. A., Baiocco, F., Draghi, S., D'Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M., & Giorgini, E. (2021). Placentita: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International*, 146, 106274. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106274>
- Reichrath, J., Lehmann, B., Carlberg, C., Varani, J., & Zouboulis, C. C. (2007). Vitamins as Hormones. *Hormone and Metabolic Research*, 39, 71-84. <https://doi.org/10.1055/s-2007-958715>
- Reichrath, J., Zouboulis, C. C., Vogt, T., & Holick, M. F. (2016). Targeting the vitamin D endocrine system (VDES) for the management of inflammatory and malignant skin diseases: An historical view and outlook. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 17(3), Article 3. <https://doi.org/10.1007/s11154-016-9353-4>
- Rivera, R., & Garrido, N. (2018). Metabolomics. *Oxidants, Antioxidants, and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction*, 277-285. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812501-4.00025-0>
- Rizal, N. S. M., Neoh, H. M., Ramli, R., Periyasamy, P. R. A. L. K., Hanafiah, A., Samat, M. N. A., Tan, T. L., Wong, K. K., Nathan, S., Chieng, S., Saw, S. H., & Khor, B. Y. (2020). Advantages and limitations of 16S rRNA next-generation sequencing for pathogen identification in the diagnostic microbiology laboratory: Perspectives from a middle-income country. *Diagnostics*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/diagnostics10100816>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

- Romanenko, L. A., Tanaka, N., Svetashev, V. I., Kalinovskaya, N. I., & Mikhailov, V. V. (2015). Rheinheimera japonica sp. Nov., a novel bacterium with antimicrobial activity from seashore sediments of the Sea of Japan. *Archives of Microbiology*, 197(4), 613-620. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1095-2>
- Ron, E., & Rosenberg, E. (2010). Acinetobacter and Alkanindiges. En K. N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1799-1803). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_130
- Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C., & Gutnick, D. L. (1979). Emulsifier of Arthrobacter RAG-1: Isolation and emulsifying properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(3), 402-408. <https://doi.org/10.1128/aem.37.3.402-408.1979>
- Roser, L. G., Agüero, F., & Sánchez, D. O. (2019). FastqCleaner: An interactive Bioconductor application for quality-control, filtering and trimming of FASTQ files. *BMC Bioinformatics*, 20(1), 361. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2961-8>
- Ross, A. A., Müller, K. M., Weese, J. S., & Neufeld, J. D. (2018). Comprehensive skin microbiome analysis reveals the uniqueness of human skin and evidence for phyllosymbiosis within the class Mammalia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(25), E5786-E5795. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801302115>
- Roth, R. R., & James, W. D. (1988). Microbial Ecology of the Skin. *Annual Review of Microbiology*, 42(1), 441-464. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.42.100188.002301>
- Ryu, S. H., Chung, B. S., Park, M., Lee, S. S., Lee, S.-S., & Jeon, C. O. (2008). Rheinheimera soli sp. Nov., a gammaproteobacterium isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(Pt 10), 2271-2274. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65489-0>
- Sabat, A. J., van Zanten, E., Akkerboom, V., Wisselink, G., van Slochteren, K., de Boer, R. F., Hendrix, R., Friedrich, A. W., Rossen, J. W. A., & Kooistra-Smid, A. M. D. (Mirjam). (2017). Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification—Increased discrimination of closely related species. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03458-6>
- Sabbath, E. L., Glymour, M. M., Berr, C., Singh-Manoux, A., Zins, M., Goldberg, M., & Berkman, L. F. (2012). Occupational solvent exposure and cognition Does the association vary by level of education? *Neurology*, 78(22), 1754-1760. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182583098>
- Sabirova, J. (2010). Polyhydroxyalkanoates Produced by Hydrocarbon-Degrading Bacteria. En K. N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 2981-2994). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_221
- Sánchez, F. A., Ille, Y., Dahmen, N., & Pereda, S. (2019). GCA-EOS extension to mixtures of phenol ethers and derivatives with hydrocarbons and water. *Fluid Phase Equilibria*, 490, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.02.017>
- Sanger, F. (1975). The Croonian Lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 191(1104), 317-333. <https://doi.org/10.1098/rspb.1975.0131>

- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441-448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Saulis, A. S., Lautenschlager, E. P., & Mustoe, T. A. (2002). Biomechanical and Viscoelastic Properties of Skin, SMAS, and Composite Flaps as They Pertain to Rhytidectomy. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 110(2), 590-598. <https://doi.org/10.1097/00006534-200208000-00035>
- Sawada, Y., & Yokota Hirai, M. (2013). Integrated LC-MS/MS system for plant metabolomics. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 4(5), e201301011. <https://doi.org/10.5936/csbj.201301011>
- Schallreuter, K. U., Lemke, K. R., Pittelkow, M. R., Wood, J. M., Körner, C., & Malik, R. (1995). Catecholamines in human keratinocyte differentiation. *The Journal of Investigative Dermatology*, 104(6), 953-957. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12606218>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537-7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Schlüter, R., & Schauer, F. (2017). *Biotransformation and Detoxification of Environmental Pollutants with Aromatic Structures by Yeasts*. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2621-8_13
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863-864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>
- Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., & Hollender, J. (2014). Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environmental Science & Technology*, 48(4), 2097-2098. <https://doi.org/10.1021/es5002105>
- Selesi, D., & Meckenstock, R. U. (2009). Anaerobic degradation of the aromatic hydrocarbon biphenyl by a sulfate-reducing enrichment culture. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 86-93. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00652.x>
- Shahabudin, S., Azmi, N. S., Lani, M. N., Mukhtar, M., & Hossain, Md. S. (2024). Candida albicans skin infection in diabetic patients: An updated review of pathogenesis and management. *Mycoses*, 67(6), e13753. <https://doi.org/10.1111/myc.13753>
- Shi, Z.-Q., Liu, Y.-S., Xiong, Q., Cai, W.-W., & Ying, G.-G. (2019). Occurrence, toxicity and transformation of six typical benzotriazoles in the environment: A review. *Science of The Total Environment*, 661, 407-421. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.138>
- Shimada, T. (2006). Xenobiotic-Metabolizing Enzymes Involved in Activation and Detoxification of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 21(4), 257-276. <https://doi.org/10.2133/dmpk.21.257>
- Shimada, T., & Fujii-Kuriyama, Y. (2004). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Science*, 95(1), 1-6. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03162.x>

- Slominski, A., Kim, T.-K., Zmijewski, M. A., Janjetovic, Z., Li, W., Chen, J., Kusniatsova, E. I., Semak, I., Postlethwaite, A., Miller, D. D., Zjawiony, J. K., & Tuckey, R. C. (2013). Novel vitamin D photoproducts and their precursors in the skin. *Dermato-endocrinology*, 5(1), 7-19. <https://doi.org/10.4161/derm.23938>
- Slominski, A. T., Kim, T.-K., Li, W., & Tuckey, R. C. (2016). Classical and non-classical metabolic transformation of vitamin D in dermal fibroblasts. *Experimental dermatology*, 25(3), 231-232. <https://doi.org/10.1111/exd.12872>
- Slominski, A. T., Zmijewski, M. A., Skobowiat, C., Zbytek, B., Slominski, R. M., & Steketee, J. D. (2012). Biogenic Amines in the Skin. En A. T. Slominski, M. A. Zmijewski, C. Skobowiat, B. Zbytek, R. M. Slominski, & J. D. Steketee (Eds.), *Sensing the Environment: Regulation of Local and Global Homeostasis by the Skin's Neuroendocrine System* (pp. 7-26). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19683-6_2
- Slominski, A., Wortsman, J., & Tobin, D. J. (2005). The cutaneous serotonergic/melatonergic system: Securing a place under the sun. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(2), 176-194. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2079rev>
- Slominski, A., Zbytek, B., Nikolakis, G., Manna, P. R., Skobowiat, C., Zmijewski, M., Li, W., Janjetovic, Z., Postlethwaite, A., Zouboulis, C. C., & Tuckey, R. C. (2013). Steroidogenesis in the skin: Implications for local immune functions. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 107-123. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.02.006>
- Solano, F. (2020). Metabolism and Functions of Amino Acids in the Skin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1265, 187-199. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45328-2_11
- Sowada, J., Lemoine, L., Schön, K., Hutzler, C., Luch, A., & Tralau, T. (2017). Toxicification of polycyclic aromatic hydrocarbons by commensal bacteria from human skin. *Archives of Toxicology*, 91(6), 2331-2341. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1964-3>
- Sowada, J., Schmalenberger, A., Ebner, I., Luch, A., & Tralau, T. (2014). Degradation of benzo[a]pyrene by bacterial isolates from human skin. *FEMS Microbiology Ecology*, 88(1), 129-139. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12276>
- Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S., Nadarajan, R., Brodie, E. L., & Lynch, S. V. (2015). Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS ONE*, 10(2), 1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117617>
- Stein, G. E., Tyrrell, K. L., Dybas, L. A., Citron, D. M., Nicolau, D. P., & Goldstein, E. J. C. (2011). Anti-anaerobic activity of serum from patients treated with tigecycline for skin/soft tissue infections. *Anaerobe*, 17(4), 213-215. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.02.006>
- Steinbrink, J., Leavens, J., Kauffman, C. A., & Miceli, M. H. (2018). Manifestations and outcomes of nocardia infections. *Medicine*, 97(40), e12436. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012436>
- Sturm, M., Schroeder, C., & Bauer, P. (2016). SeqPurge: Highly-sensitive adapter trimming for paired-end NGS data. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 208. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1069-7>

- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.-J., Gibson, G. R., Collins, M. D., & Doré, J. (1999). Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4799-4807. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.4799-4807.1999>
- Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Brown, A., Dennis, E. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., & Subramaniam, S. (2007). LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research*, 35(Database issue), D527-532. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl838>
- Sugawara, R., Maekawa, N., Sotome, K., Nakagiri, A., & Endo, N. (2022). Systematic revision of *Hydnum* species in Japan. *Mycologia*, 114(2), 413-452. <https://doi.org/10.1080/00275514.2021.2024407>
- Świzdor, A., Panek, A., Milecka-Tronina, N., & Kołek, T. (2012). Biotransformations Utilizing β -Oxidation Cycle Reactions in the Synthesis of Natural Compounds and Medicines. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijms131216514>
- Tang, Z. Z., Chen, G., Hong, Q., Huang, S., Smith, H. M., Shah, R. D., Scholz, M., & Ferguson, J. F. (2019). Multi-omic analysis of the microbiome and metabolome in healthy subjects reveals microbiome-dependent relationships between diet and metabolites. *Frontiers in Genetics*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00454>
- Tao, B. Y. (2007). Chapter 24—Industrial Applications for Plant Oils and Lipids. En S.-T. Yang (Ed.), *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (pp. 611-627). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50025-6>
- Tapase, S. R., Mawlankar, R. B., Sundharam, S. S., Krishnamurthi, S., Dastager, S. G., & Kodam, K. M. (2017). *Microvirga indica* sp. Nov., an arsenite-oxidizing Alphaproteobacterium, isolated from metal industry waste soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(9), 3525-3531. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002157>
- Tauchi, M., Hida, A., Negishi, T., Katsuoka, F., Noda, S., Mimura, J., Hosoya, T., Yanaka, A., Aburatani, H., Fujii-Kuriyama, Y., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2005). Constitutive Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Keratinocytes Causes Inflammatory Skin Lesions. *Molecular and Cellular Biology*, 25(21), 9360-9368. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.21.9360-9368.2005>
- Taxvig, C., Vinggaard, A. M., Hass, U., Axelstad, M., Metzдорff, S., & Nellemann, C. (2008). Endocrine-disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides. *International Journal of Andrology*, 31(2), 170-177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00838.x>
- Teng, Y., Luo, Y., Sun, M., Liu, Z., Li, Z., & Christie, P. (2010). Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. Strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresource Technology*, 101(10), 3437-3443. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.088>
- ThermoFisher Scientific. (2015, enero 6). *Ion16S™ Metagenomics Kit User Guide*. Thermo Fisher Scientific: Waltham, MA, USA. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0010799_Ion_16S_Metagenomics_UG.pdf
- Tholen, S., Wolf, C., Mayer, B., Knopf, J. D., Löffek, S., Qian, Y., Kizhakkedathu, J. N., Biniossek, M. L., Franzke, C.-W., & Schilling, O. (2016). Skin Barrier Defects Caused by Keratinocyte-Specific Deletion

- of ADAM17 or EGFR Are Based on Highly Similar Proteome and Degradome Alterations. *Journal of Proteome Research*, 15(5), 1402-1417. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00691>
- Thrash, A., Arick, M., & Peterson, D. G. (2018). Quack: A quality assurance tool for high throughput sequence data. *Analytical Biochemistry*, 548, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.028>
- Toyoda, M., & Morohashi, M. (2001). Pathogenesis of acne. *Medical Electron Microscopy*, 34(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s007950100002>
- Toyokawa, M., Ohana, N., Ueda, A., Imai, M., Tanno, D., Honda, M., Takano, Y., Ohashi, K., Saito, K., & Shimura, H. (2021). Identification and antimicrobial susceptibility profiles of *Nocardia* species clinically isolated in Japan. *Scientific Reports*, 11(1), 16742. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95870-2>
- Tuckey, R. C., Cheng, C. Y. S., & Slominski, A. T. (2019). The serum vitamin D metabolome: What we know and what is still to discover. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 186, 4-21. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.09.003>
- van Rensburg, J. J., Lin, H., Gao, X., Toh, E., Fortney, K. R., Ellinger, S., Zwickl, B., Janowicz, D. M., Katz, B. P., Nelson, D. E., Dong, Q., & Spinola, S. M. (2015). The Human Skin Microbiome Associates with the Outcome of and Is Influenced by Bacterial Infection. *mBio*, 6(5), e01315-01315. <https://doi.org/10.1128/mBio.01315-15>
- Vanchinathan, V., & Lim, H. W. (2012). A Dermatologist's Perspective on Vitamin D. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(4), 372-380. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.12.010>
- Vikramdeo, K. S., Anand, S., Pierce, J. Y., Singh, A. P., Singh, S., & Dasgupta, S. (2022). Distribution of microbiota in cervical preneoplasia of racially disparate populations. *BMC Cancer*, 22(1), 1074. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-10112-6>
- Wang, F., Zhang, H., Geng, N., Ren, X., Zhang, B., Gong, Y., & Chen, J. (2018). A metabolomics strategy to assess the combined toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and short-chain chlorinated paraffins (SCCPs). *Environmental Pollution*, 234, 572-580. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.073>
- Wang, J., Liu, X., Dai, Y., Ren, J., Li, Y., Wang, X., Zhang, P., & Peng, C. (2020). Effects of co-loading of polyethylene microplastics and ciprofloxacin on the antibiotic degradation efficiency and microbial community structure in soil. *Science of The Total Environment*, 741, 140463. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140463>
- Wang, L., Zheng, B., & Meng, W. (2008). Photo-induced toxicity of four polycyclic aromatic hydrocarbons, singly and in combination, to the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2), 465-472. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.12.019>
- Wang, Z., Zheng, Y., Zhao, B., Zhang, Y., Liu, Z., Xu, J., Chen, Y., Yang, Z., Wang, F., Wang, H., He, J., Zhang, R., & Abliz, Z. (2015). Human metabolic responses to chronic environmental polycyclic aromatic hydrocarbon exposure by a metabolomic approach. *Journal of Proteome Research*, 14(6), 2583-2593. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00134>
- Watanabe, N., Kryukov, K., Nakagawa, S., Takeuchi, J. S., Takeshita, M., Kirimura, Y., Mitsuhashi, S., Ishihara, T., Aoki, H., Inokuchi, S., Imanishi, T., & Inoue, S. (2018). Detection of pathogenic bacteria

- in the blood from sepsis patients using 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis. *PLOS ONE*, 13(8), e0202049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202049>
- 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), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19120-0>
- Weon, H.-Y., Son, J.-A., Yoo, S.-H., Hong, S.-B., Jeon, Y.-A., Kwon, S.-W., & Koo, B.-S. (2009). *Rubellimicrobium aerolatum* sp. Nov., isolated from an air sample in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(2), 406-410. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65856-0>
- White, G. F., Russell, N. J., & Tidswell, E. C. (1996). Bacterial scission of ether bonds. *Microbiological Reviews*, 60(1), 216-232. <https://doi.org/10.1128/mr.60.1.216-232.1996>
- Willforss, J., Chawade, A., & Levander, F. (2019). NormalizerDE: 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>
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>
- Wilson, J. W. (2012). Nocardiosis: Updates and clinical overview. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(4), 403-407. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.11.016>
- Wittich, R.-M. (1998). Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(5), Article 5. <https://doi.org/10.1007/s002530051203>
- Wong, A., & Poli, F. (2014). Solid-State 17O NMR Studies of Biomolecules. En G. A. Webb (Ed.), *Annual Reports on NMR Spectroscopy* (Vol. 83, pp. 145-220). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800183-7.00003-4>
- Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J. C., & Wong, J. K. (2016). The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology*, 25(2), 92-98. <https://doi.org/10.1111/exd.12832>
- Wright, E. S. (2016). Using DECIPHER v2.0 to analyze big biological sequence data in R. *R Journal*, 8(1), 352-359. <https://doi.org/10.32614/rj-2016-025>
- Yadav, S., Kim, J.-S., & Lee, S.-S. (2021). *Alkanindiges hydrocarbonoclasticus* sp. Nov. Isolated From Crude Oil Contaminated Sands and Emended Description of the Genus *Alkanindiges*. *Current Microbiology*, 78(1), 378-382. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02266-y>
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>
- Yang, L., Shen, Z., Wei, J., Wang, X., Xu, H., Sun, J., Wang, Q., & Cao, J. (2022). Size distribution, community composition, and influencing factors of bioaerosols on haze and non-haze days in a megacity in Northwest China. *Science of The Total Environment*, 838, 155969. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155969>

- Yang, M., Zhou, M., & Song, L. (2020). A review of fatty acids influencing skin condition. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(12), 3199-3204. <https://doi.org/10.1111/jocd.13616>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635-645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Yassin, A. F., Young, C. C., Lai, W.-A., Hupfer, H., Arun, A. B., Shen, F.-T., Rekha, P. D., & Ho, M.-J. (2007). *Williamsia serinedens* sp. Nov., isolated from an oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 3), 558-561. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.64691-0>
- Ye, G., Ding, D., Gao, H., Chi, Y., Chen, J., Wu, Z., Lin, Y., & Dong, S. (2019). Comprehensive metabolic responses of HepG2 cells to fine particulate matter exposure: Insights from an untargeted metabolomics. *Science of the Total Environment*, 691, 874-884. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.192>
- Yoon, J. H., Cho, Y. G., Lee, S. T., Suzuki, K., Nakase, T., & Park, Y. H. (1999). *Nocardioides nitrophenolicus* sp. Nov., a p-nitrophenol-degrading bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 Pt 2, 675-680. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-675>
- Yoon, J. H., Rhee, S. K., Lee, J. S., Park, Y. H., & Lee, S. T. (1997). *Nocardioides pyridinolyticus* sp. Nov., a pyridine-degrading bacterium isolated from the oxic zone of an oil shale column. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4), 933-938. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-933>
- Yoon, J.-H., & Park, Y.-H. (2006). The Genus *Nocardioides*. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes* (pp. 1099-1113). Springer. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_44
- Yoshimoto, T., Igarashi, K., Fujita, T., & Harayama, T. (1990). Synthesis of Intermediates Related to Diphenyl Ether Herbicides. *Journal of Pesticide Science*, 15(3), 341-352. <https://doi.org/10.1584/jpestics.15.341>
- Youssef, D. A., Miller, C. W., El-Abbassi, A. M., Cutchins, D. C., Cutchins, C., Grant, W. B., & Peiris, A. N. (2011). Antimicrobial implications of vitamin D. *Dermato-endocrinology*, 3(4), 220-229. <https://doi.org/10.4161/derm.3.4.15027>
- Yu, Q., Qi, Y., Zhang, H., & Pu, J. (2020). *Rheinheimera sediminis* sp. Nov., a marine bacterium isolated from coastal sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(2), 1282-1287. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003917>
- Yun, Y., Kim, H.-N., Chang, Y., Lee, Y., Ryu, S., Shin, H., Kim, W.-S., Kim, H.-L., & Nam, J.-H. (2019). Characterization of the Blood Microbiota in Korean Females with Rosacea. *Dermatology*, 235(3), 255-259. <https://doi.org/10.1159/000496968>
- Zeuthen, P., Knudsen, K. G., & Whitehurst, D. D. (2001). Organic nitrogen compounds in gas oil blends, their hydrotreated products and the importance to hydrotreatment. *Catalysis Today*, 65(2), 307-314. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(00\)00566-6](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(00)00566-6)

- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., & Stamatakis, A. (2014). PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30(5), 614-620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>
- Zhang, W., Song, Y., Chai, T., Liao, G., Zhang, L., Jia, Q., Qian, Y., & Qiu, J. (2020). Lipidomics perturbations in the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to chiral ibuprofen. *Science of The Total Environment*, 713, 136565. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136565>
- Zhang, W., Zhu, S., Cheng, Y., Ding, L., Li, S., Peng, N., & He, S. (2020). Rheinheimera mangrovi sp. Nov., a bacterium isolated from mangrove sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(12), 6188-6194. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004513>
- Zhang, X., Feng, G.-D., Zhen, X., Zhang, Y., Deng, X., Zhu, H., & Yao, Q. (2022). Microvirga terricola sp. Nov. And Microvirga solisilvae sp. Nov, isolated from forest soil. *Archives of Microbiology*, 204(7), 423. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02963-1>
- Zheng, Y., Yin, H., Boeglin, W. E., Elias, P. M., Crumrine, D., Beier, D. R., & Brash, A. R. (s. f.). Lipoxigenases Mediate the Effect of Essential Fatty Acid in Skin Barrier Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(27), 24046-24056. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.251496>
- Zhou, M., Gan, Y., He, C., Chen, Z., & Jia, Y. (2018). Lipidomics reveals skin surface lipid abnormality in acne in young men. *British Journal of Dermatology*, 179(3), 732-740. <https://doi.org/10.1111/bjd.16655>
- Zhuang, K., Liu, Y., Dai, Y., Xu, J., Li, W., Ming, H., Pradhan, S., Ran, X., Zhang, C., Feng, Y., & Ran, Y. (2021). Nocardia huaxiensis sp. Nov., an actinomycete isolated from human skin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(8). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004970>

Anexos

Anexo A. Tablas suplementarias

Repositorio de Github donde se almacenan las tablas:

https://github.com/froz9/Skin_Exposed_Hydrocarbons_Thesis/tree/main

Tabla 5. Datos de abundancia bacteriana utilizados para análisis estadísticos y comparaciones entre grupos (transformados en log10) (Disponible como archivo CSV)

Tabla 6. Resultados de la prueba de Adonis para todos los grupos.

Comparación	Suma de cuadrados	F	R2	Pr(>F) ^a	Distancia Unifrac
NE vs E	0.3603	2.1467	0.1066	0.0050	No Ponderada
NE vs E	6.0498	1.7350	0.0879	0.1180	Ponderada
NEA vs NEH	0.0985	0.7505	0.0858	0.9540	No Ponderada
NEA vs EA	0.1850	1.1583	0.1265	0.1990	No Ponderada
NEA vs EH	0.3275	1.7774	0.1818	0.0590	No Ponderada
NEH vs EA	0.2122	1.4146	0.1503	0.0440	No Ponderada
NEH vs EH	0.3427	1.9632	0.1970	0.0490	No Ponderada
EA vs EH	0.2484	1.2231	0.1326	0.1320	No Ponderada
NEA vs NEH	2.3575	0.5423	0.0635	0.6950	Ponderada
NEA vs EA	2.5891	0.7734	0.0882	0.5200	Ponderada
NEA vs EH	5.6976	1.9996	0.2000	0.1010	Ponderada
NEH vs EA	3.0420	0.6783	0.0782	0.7580	Ponderada
NEH vs EH	4.8601	1.2191	0.1322	0.2690	Ponderada
EA vs EH	1.7318	0.5797	0.0676	0.7880	Ponderada

Abreviaturas: E, individuos expuestos; NE, individuos no expuestos; EH, manos de individuos expuestos; NEH, manos de individuos no expuestos; EA, brazos de individuos expuestos, y; NEA, brazos de individuos no expuestos; F, valor estadístico pseudo-F, y; R2, coeficiente de determinación (parcial).

^aValores de *p* (adonis por pares) en negrita indican significancia.

Tabla 7. Clasificación taxonómica de los identificadores ASV (Disponible como archivo CSV)

Tabla 8. Tabla de cuantificación de abundancia de géneros normalizada e imputada para todas las muestras (transformada en log10) (Disponible como archivo CSV)

Tabla 9. Tabla de cuantificación de atributos de datos metabolómicos (transformados en log2) (Disponible como archivo CSV)

Tabla 10. Lista de metabolitos anotados por GNPS mediante herramientas de correspondencia espectral y anotación de estructura *in silico* (Disponible como archivo CSV)

Tabla 11. Lista de metabolitos supuestamente anotados con abundancia diferencial entre los grupos EH y NEH (Disponible como archivo XLSX)

Tabla 12. Lista de metabolitos anotados con abundancia diferencial entre los grupos EA y NEA (Disponible como archivo XLSX)

Anexo B. Protocolo modificado para el kit de aislamiento de ADN PowerSoil®

1. Descongele la muestra a 37 °C durante 10 min.
2. Retire la solución del tubo PowerBead (~750 µl).
3. Agregue los 750 µl a la muestra liofilizada.
4. Mezcle con cuidado. Asegúrese de que no haya precipitaciones.
5. Agite suavemente con un vórtex para mezclar.
6. Agregue 60 µl de la solución C1 e invierta varias veces o agite brevemente con un vórtex.
7. Incube a 70 °C durante 15 min en un bloque térmico o baño de agua.
8. Enfríe a temperatura ambiente durante 5 min.
9. Homogeneizar utilizando un instrumento FastPrep-24 (MP Biomedicals, Irvine, CA, EE. UU.) (6 m/s, 7 ciclos × 45 s)
10. Fijar los tubos horizontalmente en el vórtex y agitar a máxima velocidad durante 10 min.
11. Centrifugar los tubos a 10 000 g durante 30 s.
12. Transferir el sobrenadante (hasta 600 µl) a un tubo de recolección limpio de 2 ml.
13. Añadir 250 µl de Solución C2 y agitar durante 5 segundos. Incubar a 4 °C durante 5 min.
14. Centrifugar los tubos a 10 000 g durante 1 min.
15. Transferir el sobrenadante (hasta 600 µl) a un tubo de recolección limpio de 2 ml.
16. Agregue 200 µl de Solución C3 y agite brevemente. Incube a 4 °C durante 5 min.
17. Centrifugue los tubos a 10 000 g durante 1 min.
18. Transfiera hasta 750 µl de sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 ml. Tenga cuidado de evitar el sedimento.
19. Agregue 1,2 ml de Solución C4 al sobrenadante y agite durante 5 s. Agite la Solución C4 para mezclarla antes de agregarla.
20. Pipetee 675 µl del sobrenadante a un filtro giratorio y centrifugue a 10 000 g durante 1 min. Descarte el líquido que se haya filtrado. Repita hasta que todos los sobrenadantes hayan pasado por la columna.
21. Agregue 500 µl de Solución C5 y centrifugue a 10 000 g durante 30 s.
22. Descarte el flujo.
23. Vuelva a centrifugar a 10 000 g durante 1 minuto.

24. Coloque el filtro de centrifugación en un tubo de recolección de 2 ml limpio y etiquetado.
25. Agregue 50 μ l de solución C6 al centro de la membrana del filtro.
26. Centrifugue a 10 000 g durante 1 minuto.
27. Agregue 30 μ l de agua de grado PCR sin ADN y repita los pasos 26 y 27 en otro tubo de recolección de 2 ml.

Descarte el filtro de centrifugación. El ADN en el tubo ahora está listo para cualquier aplicación posterior.

Anexo C. Formato reclutamiento



COMITÉ DE BIOÉTICA-CICESE
PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS CON HUMANOS

Solamente para el uso del comité	
Número de folio proyecto:	
Fecha de aprobación del proyecto:	
Número de folio anterior del proyecto (si aplica):	
Corrección # (si aplica):	
Fecha de aprobación de la corrección:	

1. DATOS GENERALES DE LOS RESPONSABLES DEL PROYECTO:

Datos generales del responsable	
Nombre completo:	Aldo Moreno Ulloa
Correo electrónico:	amoreno@cicese.mx
Departamento:	Innovación Biomédica
Teléfono:	646-175-0500 ext.27211
Celular:	6643171929
Datos generales del suplente	
Nombre completo:	Alan Gerardo Hernández Melgar
Correo electrónico:	alangerardo@cicese.edu.mx
Departamento:	Innovación Biomédica
Teléfono:	5567094138

* Tanto el investigador responsable como el suplente deben de estar localizables en todo momento cuando haya experimentos en marcha.

2. DATOS GENERALES DEL PROYECTO:

Nombre del proyecto:	Evaluación del metaboloma de la piel humana expuesta a derivados de hidrocarburos
Clave del proyecto (si aplica):	
Fecha de inicio del proyecto (dd-mm-aaaa):	06-01-2021
Fecha de término del proyecto (dd-mm-aaaa):	31-12-2021
Fuente de financiamiento (si aplica):	685109 y 685604

Importante: Lea cuidadosamente las instrucciones en cada sección antes de completar el protocolo de la narrativa.

RESUMEN NO-TÉCNICO

Proporcione un resumen no técnico del proyecto de investigación que está proponiendo a realizar. El resumen deberá incluir un breve enunciado del propósito de la investigación, adicionalmente debe incluir una descripción de los procedimientos, métodos, y materiales a utilizar de acuerdo a que el estudio se llevará a cabo con la población. **El resumen no deberá exceder de una página.**

Los humanos estamos constantemente expuestos a sustancias químicas con efectos potencialmente negativos en nuestra salud¹. Particularmente, los derivados de petróleo (hidrocarburos [HC]) son omnipresentes en nuestro ambiente debido a que muchos constituyen una gran cantidad de los productos que utilizamos regularmente y nuestra piel es el principal punto de contacto con ellos. La jalea de petróleo, parafina blanda, petrolato o petróleo blanco mas comúnmente conocida como Vaselina, es uno de los derivados de hidrocarburos más importantes ya que es un constituyente regular en la formulación de muchos productos². Esta es un semisólido compuesto por una mezcla de hidrocarburos saturados de cadena larga (más de 25 átomos de carbono generalmente) que se obtienen a partir del refinamiento del petróleo. Identificada con el número CAS 8009-03-8³ es un agente no sensibilizante, no irritante y con propiedades oclusivas lo que lo convierte en uno de los vehículos por excelencia para la administración de fármacos por vía tópica además de ser parte activa en la composición de muchos cosméticos (hasta un 17.2%²).

Existe poca información respecto a la toxicidad de esta sustancia, se le considera generalmente inocua; la dosis letal 50 en ratón es de 50000 mg/Kg³. Existe un estudio⁴ que reporta irritación dérmica en la piel de conejos mas no en la de ratones, ratas y mini cerdos, asociado con las significativas diferencias que existen en la composición lipídica grosor y pH de la dermis de humanos y conejos por que desaconsejan utilizar a estos últimos como modelo de estudio cuando se evalúen productos que en su composición presenten petrolato. Al día de hoy en humanos solo existen algunos reportes aislados de hipersensibilidad como respuesta alérgica al petrolato. Entre ellos sobre sale un reporte⁵ de hiperpigmentación la cuál se resolvió suspendiendo su uso. Debido a lo anterior se puede concluir que es prácticamente inocua y poco se conoce acerca del destino (p. Ej. Degradación) de este producto en nuestro organismo. También es importante señalar que nuestra piel alberga un ecosistema compuesto por una gran diversidad microorganismos

incluyendo bacterias⁶. Estudios han demostrado que ciertos grupos de bacterias – principalmente en muestras ambientales- son capaces de degradar HC produciendo metabolitos distintos al de células eucariotas (queratinocitos)^{7,8}. Sin embargo, no existen estudios que evalúen *in situ* el metaboloma de la piel expuesta a los HC y nuestro entendimiento del destino de los HC en dicho órgano es precario. Este protocolo de investigación, propone evaluar si una zona de la piel expuesta a un derivado de HC (Vaselina) de uso común y muy extendido produce un metabolismo celular y bacteriano diferente al no expuesto. Como modelo de estudio, se estudiarán sujetos sanos y que tendrán la piel expuesta a la vaselina. La metodología a emplear consistirá en la aplicación diaria, cada noche durante una semana (7 días) en la parte dorsal de la mano derecha de aproximadamente un gramo de vaselina, al octavo día se procederá a realizar una recolección –no invasiva y sin riesgo a la salud– de residuos orgánicos de la superficie de la piel expuesta a la Vaselina (mano derecha) y de la mano izquierda (no exposición) utilizando un hisopo de algodón empapado de una solución de agua:etanol (1:1 volumen) para cada toma de muestra. Esta técnica permite extraer compuestos que serán analizados por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Los datos generados por LC-MS serán procesados y analizados por distintos softwares especializados (ProteoWizard, MZmine, GNPS, NAP, MS2LDA, SIRIUS), siguiendo la metodología reportada en Moreno-Ulloa y colaboradores⁹. Todo el material necesario para la realización de este protocolo está disponible y presente en el Departamento de Innovación Biomédica.

SECCIÓN I: ROLES Y EXPERIENCIA DEL EQUIPO QUE TRABAJARÁ EN EL ESTUDIO

Liste todos los miembros que trabajarán en el equipo de investigación

1. Describa los **roles específicos y responsabilidades** que tendrá cada miembro dentro del estudio.
2. Explique quien tendrá acceso a los datos.
3. Indique quien estará involucrado en el reclutamiento, documentos de consentimiento, procedimientos de investigación, y análisis de datos.
4. Proporcione una descripción de sus habilidades, nivel de entrenamiento y experiencia en su área de estudio y en relación a proyectos relacionados con individuos con autismo.

Investigador líder:

Aldo Moreno Ulloa. En general, un servidor cuenta con la experiencia en el procesamiento de muestras biológicas, análisis por LC-MS y uso de softwares quimioinformáticos. Prueba de esto son las publicaciones en revistas indizadas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Aldo+Moreno+Ulloa>) y

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/606806v1>) donde se consta mi participación en el procesamiento de muestras biológicas para la determinación de compuestos mediante el empleo de la LC-MS y softwares bioinformáticos. La responsabilidad de un servidor se centra en la realización del estudio, escritura de resúmenes, publicación de artículos que emanen de esta investigación, resguardo de datos confidenciales de los sujetos involucrados y financiamiento del estudio.

Co-investigadores:

Ninguno

Equipo de técnicos, estudiantes y asistentes de investigación:

Alan Gerardo Hernández-Melgar. El estudiante ha sido entrenado para este ensayo aunado a su formación y experiencia en el procesamiento de muestras, análisis por LC-MS y uso software quimioinformáticos.

SECCIÓN II: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN Y PROCEDIMIENTOS EN EL ESTUDIO

A. Diseño del estudio y procedimientos

1. Proporcione una **descripción cronológica detallada** de todos los procedimientos en el estudio (e.g., incluya las fases del estudio y el diseño experimental). Incluya una explicación del diseño del estudio.
2. Indique la duración de cada una de las fases en el estudio. Indique cuanto tiempo estarán involucrados los sujetos de estudio.
3. Si el estudio incluye la obtención de datos como fotografías, audio y/o videgrabaciones, especifique si se recopilará información que identifique a los sujetos del estudio, o indicar que información identificable se obtendrá.

Este protocolo propone la realización de un estudio clínico de intervención. La intervención consiste en la administración tópica, de aproximadamente un gramo de vaselina superficie dorsal de la mano dominante, diariamente durante 1 semana. Siendo el mismo individuo su grupo control dado que la mano contraria de la que suele usar habitualmente nos va a servir de control (no exposición). Posterior de los 7 días (día 8) se procederá a la toma de muestra las cuáles consistirán en una rápida (menos de 10 segundos) recolección de muestras superficiales de la piel mediante el uso de un hisopo de algodón empapado en agua y etanol (50:50 volumen). Posteriormente, las muestras serán procesadas en el laboratorio del Departamento de Innovación Biomédica (DIB) de CICESE, utilizando métodos comunes de

centrifugación, mezclado (vortex), evaporación (SpeedVac) y resuspensión de la muestra en solventes para su posterior análisis especializado por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. Los datos generados serán analizados por softwares quimioinformáticos siguiendo la metodología reportada por el laboratorio del doctor Moreno-Ulloa⁹. En breve, Los archivos en formato .wiff y .wiff scan serán convertidos a formato .mzML con ProteoWizard y después procesados con MZmine 2.34 para detectar los metabolitos. Para la creación de redes moleculares, se utilizará la plataforma digital GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>), NAP, MS2LDA y SIRIUS.

Condición: No utilizar crema corporal durante todo el estudio. La administración del petrolato será todas las noches en la parte dorsal de la mano dominante antes de dormir. La toma de muestra será un día después de la última administración antes de bañarse.

El tiempo de análisis de los datos será de 6 meses a 12 meses.

El estudio también propone recolectar información personal de los sujetos. No obstante, la información recopilada no pondrá en riesgo su integridad física ni moral. Las variables a recolectar serán características clínicas generales incluyendo, edad, genero, talla, tiempo expuesto a derivados de petróleos. Además, se pedirá consentimiento reportado para la toma de fotografías de la mano (dorso o palma) con el objetivo de recrear 3D la zona anatómica y señalar la ubicación precisa de los metabolitos detectados.

SECCIÓN III: SUJETOS DE ESTUDIO (PERSONAS QUE SERÁN SUJETOS DE ESTUDIO)

A. Criterios de Inclusión y Exclusión

1. Describa las características y proporcione la justificación para la inclusión de los sujetos en el estudio. Por lo menos incluya información acerca de la edad y género de los sujetos de estudio.
<ol style="list-style-type: none"> 1. Edad mayor a 18 años. Requerida por que en el ordenamiento jurídico esta es la edad mínima con la que un individuo se considera con la madurez intelectual y física para tener una voluntad válida. 2. Consentimiento reportado. Con este procedimiento se garantiza que el sujeto ha expresado voluntariamente su intención de participar en el estudio. 3. Sexo masculino. Para disminuir la variabilidad debida a los cambios en los ciclos hormonales.
2. Describa los criterios de exclusión para los sujetos de estudio propuestos, si es aplicable.
<ol style="list-style-type: none"> 1. Sexo femenino. 2. Piel expuesta constantemente a derivados de petróleo.

3. Diagnóstico de enfermedades infecto-contagiosas; incluyendo síntomas de resfriado o gripe.
4. Enfermedades autoinmunes.
5. Cáncer.
6. Enfermedades de la piel; dermatitis atópica, psoriasis, rosácea, eccema, etc.

SECCIÓN IV: PROCESO Y MÉTODOS DE RECLUTAMIENTO

A. Métodos de reclutamiento

Seleccione todas las opciones que apliquen a los métodos de reclutamiento que se utilizarán en el estudio. Utilice una 'X' dentro de los corchetes [].

Se utilizarán folletos, notificaciones, reuniones, memorándums, y/o medios para reclutar a los sujetos. Adjuntar documentos.

- Explique dónde y cómo se publicarán los materiales de reclutamiento. Se enviará correo a estudiantes para solicitar su disponibilidad

Otros métodos:

B. Proceso de reclutamiento

1. Proporcione detalles y describa el proceso de reclutamiento (i.e., cuando, donde, quien lo hará, y cómo se contactará a los sujetos)

Se buscarán individuos que cuenten con los criterios de inclusión y se les mostrará el documento de consentimiento reportado. Los sujetos que acepten firmando el documento, se les proporcionará la vaselina y una vez finalizada la semana de aplicación serán entonces muestreados como se indica en este documento.

SECCIÓN V: PROCESO PARA SOLICITAR CONSENTIMIENTO

Describa los pasos específicos para solicitar consentimiento de participación.

1. Incluya información acerca de **cuándo y dónde** se realizará la solicitud de consentimiento, la **duración de la sesión**, y el tiempo que se les dará a los sujetos para que decidan si quieren participar en el estudio.

El documento de consentimiento será mostrado a los sujetos y se les dará 30 minutos para leerlo. Las dudas generadas serán resueltas en el momento.

SECCIÓN VI: CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS DERIVADOS DE LA INVESTIGACIÓN

A. Método para grabar datos/retención de datos/acceso a datos

1. Explique cómo se obtendrán y grabarán los datos
<p>Seleccione todas las opciones que apliquen:</p> <p><input type="checkbox"/> En papel, documentos/archivos</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Archivos digitales/bases de datos</p> <p><input type="checkbox"/> Grabaciones en audio</p> <p><input type="checkbox"/> Grabaciones en video</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Fotografías</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Muestras biológicas</p> <p><input type="checkbox"/> Otro(s) (especifique):</p>
2. Indique cómo se guardarán los datos, cómo se mantendrá la seguridad de los datos, incluyendo registros, documentos, archivos electrónicos, audio y video, etc.
<p>Los datos serán guardados en un disco duro y respaldados en google drive con acceso restringido. El disco duro, con medidas de encriptación de datos y contraseña de acceso, estará resguardado por el investigador principal del proyecto en las instalaciones del Departamento de Innovación Biomédica. El permiso de acceso a los datos de google drive será otorgado exclusivamente por el investigador principal, quien será el titular de la cuenta. Los datos personales, incluyendo edad, genero, talla, peso y fotografías de la piel, solo serán utilizados por el grupo de investigación con fines científicos que emanen de este proyecto.</p>
3. Especifique quién tendrá acceso a los datos identificables de los sujetos
<p>[x] El equipo de investigación autorizado por el líder del estudio. Cualquier dato obtenido en el estudio que identifique a un sujeto no será voluntariamente revelado sin la autorización de los sujetos, excepto que sean requeridos para un procedimiento legal. Las publicaciones/presentaciones que resulten de este estudio no incluirán información que identifique a los sujetos.</p> <p><input type="checkbox"/> Otro: <Especifique></p>

Referencias:

1. McKee, R. H. & White, R. The Mammalian Toxicological Hazards of Petroleum-Derived Substances: An Overview of the Petroleum Industry Response to the High Production Volume Challenge Program. *Int. J. Toxicol.* **33**, 4S-16S (2014).
2. Panico, A. *et al.* Skin safety and health prevention: An overview of chemicals in cosmetic products. *J. Prev. Med. Hyg.* **60**, E50–E57 (2019).
3. Michael, C. ChemIDplus - 8009-03-8 - Petrolatum [USP] - Searchable synonyms, formulas, resource links, and other chemical information. (2021). Available at: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/8009-03-8>. (Accessed: 14th March 2021)
4. Chandra, S. A. *et al.* Dermal irritation of petrolatum in rabbits but not in mice, rats or minipigs. *J. Appl. Toxicol.* **34**, 857–861 (2014).
5. Maibach, H. Chronic dermatitis and hyperpigmentation from petrolatum. *Contact Dermatitis* **4**, 62–62 (1978).
6. Byrd, A. L., Belkaid, Y. & Segre, J. A. The human skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 143–155 (2018).
7. Bian, X. Y. *et al.* Insights into the anaerobic biodegradation pathway of n-Alkanes in oil reservoirs by detection of signature metabolites. *Sci. Rep.* **5**, 1–12 (2015).
8. Brooijmans, R. J. W., Pastink, M. I. & Siezen, R. J. Hydrocarbon-degrading bacteria: The oil-spill clean-up crew. *Microb. Biotechnol.* **2**, 587–594 (2009).
9. Moreno-Ulloa, A. *et al.* Metabolic and metagenomic profiling of hydrocarbon-degrading microorganisms obtained from the deep biosphere of the Gulf of México. *bioRxiv* (2019). doi:<https://doi.org/10.1101/606806>