

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOINFORMÁTICA



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Estudio del perfil lipídico de vesículas
extracelulares en adolescentes expuestos a
intoxicación alcohólica con perspectiva de sexo**

AUTORA:

CARLA PERPIÑÁ CLÉRIGUES

TUTORES:

FRANCISCO GARCÍA GARCÍA

MARÍA PASCUAL MORA

JULIO, 2021



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria **ETSE-UV**

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOINFROMÁTICA

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Estudio del perfil lipídómico de vesículas extracelulares en adolescentes expuestos a intoxicación alcohólica con perspectiva de sexo

AUTORA:

CARLA PERPIÑÁ CLÉRIGUES

TUTORES:

FRANCISCO GARCÍA GARCÍA

MARÍA PASCUAL MORA

TRIBUNAL:

PRESIDENTE/A:

VOCAL 1:

VOCAL 2:

FECHA DE DEFENSA:

CALIFICACIÓN:

Resumen

Evidencias recientes muestran el papel de las vesículas extracelulares como importantes comunicadores entre células en procesos patológicos, como la inflamación. Considerando que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica podrían ser buenos biomarcadores no invasivos y su contenido en lípidos podría participar en la biogénesis y liberación de estas vesículas. La hipótesis de este trabajo es demostrar si la intoxicación alcohólica presenta un papel relevante a nivel lipídico en las vesículas extracelulares plasmáticas procedentes de individuos adolescentes y su posible perfil diferencial por sexo. Para ello, se han utilizado análisis de expresión diferencial y caracterización funcional de los datos lipídicos. Los resultados muestran que existen lípidos expresados diferencialmente entre chicas y chicos adolescentes, al mismo tiempo que también existen diferencias significativas entre los grupos etanol y control. Además, la caracterización funcional muestra clases de lípidos (*main class Fatty Acids* y su correspondiente *super class Fatty Acyls*) más representadas en el grupo de chicas con intoxicación alcohólica, las cuales están relacionadas con la respuesta inmune inflamatoria. Estos datos se correlacionan con resultados previos de nuestro grupo, en los que se ha visto que las chicas adolescentes son más vulnerables a los efectos del alcohol (ej. mayor expresión de parámetros inflamatorios) que los chicos. Por ello, podemos concluir que los lípidos de las vesículas extracelulares plasmáticas podrían ser buenos candidatos a biomarcadores y nos pueden ayudar a explicar los mecanismos que subyacen a la respuesta neuroinflamatoria tras una intoxicación aguda.

Palabras clave:

vesículas extracelulares, alcohol, lipídica, expresión diferencial, LSEA, diferencias de sexo

Recent evidence shows the role of extracellular vesicles as important cell communicators in pathological processes, such as inflammation. Their ability to cross the blood-brain barrier could become them as good non-invasive biomarkers and their lipid content could participate in the biogenesis and release of these vesicles. The hypothesis of this work is to demonstrate whether alcohol intoxication has a relevant role at the lipidomic level in plasma extracellular vesicles of adolescents and its possible differential profile by sex. For this, differential expression analysis and functional characterization of lipidomic data have been used. The results show that there are lipids expressed differentially between adolescent girls and boys, as well as there are also significant differences between the ethanol and control groups. Furthermore, the functional characterization shows lipid classes (main class Fatty Acids and its corresponding super class Fatty Acyls) more represented in the girls after an alcohol intoxication than in control counterparts, which are related to the inflammatory immune response. These data correlate with previous results from our group, in which we have demonstrated that adolescent girls are more sensitive to the effects of alcohol (e.g., higher expression of inflammatory molecules) than boys. Therefore, we can conclude that the lipids of the plasma extracellular vesicles could be good candidates as biomarkers and can help us to explain the mechanisms underlying the neuroinflammatory response after acute alcohol intoxication.

Palabras clave:

extracellular vesicles, alcohol, lipidomics, differential expression, LSEA, sex differences

Agradecimientos

En primer lugar, a Paco y María, por su buen humor y por darme la oportunidad de participar en este proyecto.

A mi tercer tutor en la sombra, José (José F. Català Senent), por todos los consejos y por lo que he podido aprender de él.

Gracias a los tres por contestar a todas mis dudas y sacar siempre un hueco para ayudarme.

A mis compañeras, Almudena, Lucía e Irene, por el apoyo y los ánimos.

A mis padres, a Raquel y a Ramón, por no dejar nunca de creer en mí.

Índice de contenidos

1	Introducción	1
1.1	Consumo abusivo de alcohol en adolescentes	1
1.1.1	Prevalencia y patrón de consumo de alcohol en la adolescencia.....	1
1.1.2	Efectos del consumo de alcohol en atracción	3
1.2	Alcohol y vesículas extracelulares	4
1.2.1	Vesículas extracelulares	4
1.2.2	Lípidos en las vesículas extracelulares	6
1.3	Ómicas.....	7
1.3.1	Lipidómica en bioinformática.....	7
2	Hipótesis y objetivos.....	11
3	Material y métodos	12
3.1	Sujetos	12
3.2	Obtención de las vesículas extracelulares y aislamiento de la fracción lipídica.....	13
3.3	Procesamiento de los datos	13
3.3.1	Unificación de la nomenclatura de los lípidos.....	13
3.3.2	Análisis exploratorio	14
3.4	Análisis de expresión diferencial	14
3.4.1	limma	15
3.4.2	Análisis de la varianza (ANOVA)	15
3.5	Caracterización funcional.....	16
4	Resultados	18
4.1	Procesamiento de los datos	18
4.1.1	Unificación de la nomenclatura de los lípidos.....	18
4.1.2	Análisis exploratorio	18
4.2	Expresión diferencial	23
4.2.1	Limma	23
4.2.2	Análisis de la varianza (ANOVA)	24
4.2.3	Evaluación de los métodos	24
4.3	Caracterización funcional.....	25
4.3.1	Anotación funcional.....	25
4.3.2	Análisis de enriquecimiento funcional	28
5	Discusión	31
6	Conclusiones.....	37
7	Referencias.....	38

Índice de figuras

Figura 1.1. Porcentaje total de muertes atribuidas al alcohol por grupos de edad en 2016...1	1
Figura 1.2. Prevalencia (%) de episodios de consumo excesivo de alcohol (HED) entre los jóvenes de 15 a 19 años, 2016.....2	2
Figura 1.3. Prevalencia de consumo de alcohol en atracción (binge drinking) en los últimos 30 días en la población española de 15-64 años, según edad y sexo (%)..3	3
Figura 1.4. Formación de exosomas por la fusión de cuerpos multivesiculares (MVB) con la membrana plasmática.....5	5
Figura 1.5. Liberación de exosomas por parte de las células astrogliales y microgliales tras una agresión neural como respuesta neuroinflamatoria.5	5
Figura 1.6. Flujos de trabajo de la lipidómica.....8	8
Figura 4.1. Clustering de las muestras de lípidos negativos. 19	19
Figura 4.2. PCA de las muestras de lípidos negativos..... 19	19
Figura 4.3. A. Diagrama de cajas por muestra en lípidos negativos.....20	20
Figura 4.3. B. Ejemplo de diagrama de cajas de cada lípido por grupo experimental de 5 lípidos negativos.20	20
Figura 4.4. Clustering de las muestras de lípidos positivos.....21	21
Figura 4.5. PCA de las muestras de lípidos positivos.....22	22
Figura 4.6. A. Diagrama de cajas por muestra en lípidos positivos.....22	22
Figura 4.6. B. Ejemplo de diagrama de cajas de cada lípido por grupo experimental de 5 lípidos positivos23	23
Figura 4.7. Comparación de los resultados significativos entre ambas metodologías.....25	25
Figura 4.8. Clasificación de todos los lípidos negativos en diferentes niveles de agrupación funcional.....26	26
Figura 4.9. Clasificación de todos los lípidos positivos en diferentes niveles de agrupación funcional.....26	26
Figura 4.10. Gráficos de interacción para la super class FattyAcyls y main class Fatty acids significativa en lípidos negativos para el contraste de interacción.30	30
Figura 5.1. Número de publicaciones entre 2000 y 2019 en PubMed relacionadas con genómica, proteómica o lipidómica de exosomas.32	32

Índice de tablas

Tabla 1.1. Diferentes formas de anotar un mismo lípido según sus grados de resolución estructural.....	10
Tabla 3.1. Características de los sujetos del estudio en los cuatro grupos experimentales según sexo y tratamiento.....	13
Tabla 3.2. Grupos de estudio para las comparaciones.....	15
Tabla 4.1. Número de lípidos iniciales y finales, tras la fase de procesamiento.	18
Tabla 4.2. Resumen de los resultados significativos del análisis de expresión diferencial con limma.....	23
Tabla 4.3. Resumen de los resultados significativos del análisis de expresión diferencial ANOVA.....	24
Tabla 4.4. Resumen de los resultados significativos en ambas metodologías.....	24
Tabla 4.5. Clasificación por niveles de todos los lípidos negativos.	27
Tabla 4.6. Clasificación por niveles de todos los lípidos positivos.	28
Tabla 4.7. Resultados de las diferentes clases significativas del LSEA.	29

Acrónimos

ANOVA	Análisis de la varianza
API	Interfaz de programación de aplicaciones
BAL	Niveles de alcohol en sangre
BH	Benjamini & Hochberg (método de corrección del p-valor, también FDR)
BY	Benjamini & Yekutieli (método de corrección del p-valor)
CAR	Acylcarnitine
Cer_ADS	Ceramide α -hydroxy fatty acid-dihydrosphingosine
Cer_AP	Ceramide α -hydroxy fatty acid-phytosphingosine
Cer_AS	Ceramide α -hydroxy fatty acid-sphingosine
Cer_EODS	Ceramide esterified ω -hydroxy fatty acid-dihydrosphingosine
Cer_NDS	Ceramide non-hydroxy fatty acid-dihydrosphingosine
Cer_NP	Ceramide non-hydroxy fatty acid-phytosphingosine
Cer_NS	Ceramide non-hydroxy fatty acid-sphingosine
DAG	Diacylglycerol
DGTS	Diacylglyceryl-trimethylhomoserine
FA	Fatty acid
FAHFA	Fatty acid ester of hydroxyl fatty acid
GO	Gene Ontology (base de datos)
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
HexCer_AP	GlucosylCeramide/HexosylCeramide α -hydroxy fatty acid-phytosphingosine
HexCer_NDS	GlucosylCeramide/HexosylCeramidesnon-hydroxyfatty acid-dihydrosphingosine
HexCer_NS	GlucosylCeramide/HexosylCeramidesnon-hydroxyfatty acid-sphingosine
HMDB	The Human Metabolome Database (HMDB)
ILCNC	Clasificación Internacional de Lípidos y el Comité de Nomenclatura
IQR	Rango intercuartílico

IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
IUPAC-IUB	Comisión de Nomenclatura Biológica de la IUPAC
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (base de datos)
LIPEA	Lipid Pathway Enrichment Analysis
logFC	Logaritmo de la magnitud de cambio
LOR	Logaritmo de los odds ratio
LPC	Lyso-phosphatidylcholine
LPE	Lyso-phosphatidylethanolamine
LSEA	Lipid Set Enrichment Analysis
OxPC-O	Oxidized etherphosphatidylcholine (OxEtherPC)
OxPI	Oxidized Phosphatidylinositols
PA	Phosphatidic acid
PC	Phosphatidylcholine
PC-O	Etherphosphatidylcholine (EtherPC)
PCA	Análisis de componentes principales
PE	Phosphatidylethanolamine
PE-O	Etherphosphatidylethanolamine (EtherPE)
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
RefMet	A Reference list of Metabolite names (base de datos)
RT	Tiempo de retención
SHexCer	SulfoglucosylCeramide/SulfohexosylCeramide
SM	Sphingomyelin
SQDG	Sulfoquinovosyl-diacylglycerol
TAG	Triacylglycerol (TG)
TLR4	Receptor 4 tipo Toll

1 Introducción

1.1 Consumo abusivo de alcohol en adolescentes

1.1.1 Prevalencia y patrón de consumo de alcohol en la adolescencia

El alcohol es una sustancia tóxica y psicoactiva con capacidad de crear dependencia. No obstante, es aceptada y normalizada por la sociedad formando parte de nuestro día a día, sin reparar en el daño que su consumo nos puede ocasionar. Por ello, es la droga legal más consumida en todo el mundo entre los 15-64 años y una de las primeras que eligen los adolescentes (World Health Organization, 2019). Aproximadamente el 80% de los estudiantes europeos de 16 años que participaron en 2019 en el estudio realizado por la European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs (ESPAD), afirmaron que les resultaría fácil obtener una bebida alcohólica si quisieran (ESPAD, 2019).

A pesar de su aprobación social, un 5,1% de las muertes a nivel mundial se producen a causa de la ingesta de alcohol, siendo aproximadamente 3 millones de muertes cada año y se relaciona con diferentes discapacidades y con la mala salud de millones de personas. Además, es el principal factor de riesgo de mortalidad prematura y de discapacidad entre las personas de 15 a 49 años (“WHO, *alcohol*,” no date), y como podemos ver en la Figura 1.1, en Europa el porcentaje de las muertes con respecto a otros rangos de edad es especialmente destacable (World Health Organization, 2019).

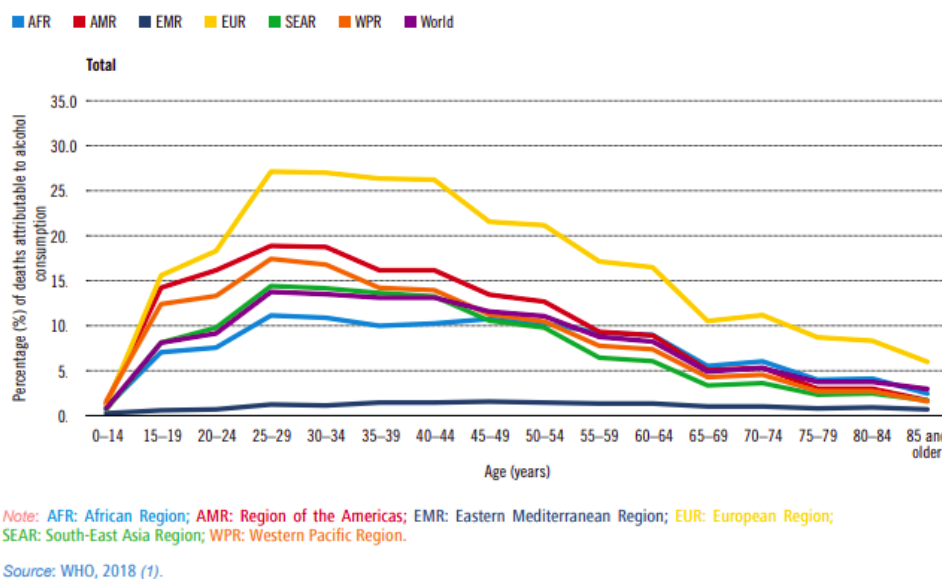


Figura 1.1. Porcentaje total de muertes atribuidas al alcohol por grupos de edad en 2016.
Fuente: Global status report on alcohol and health 2018, World Health Organization, 2019.

En el informe de la ESPAD, anteriormente citado, también se vio que en Europa más de un tercio de los 99.647 estudiantes de 16 años habían probado una bebida alcohólica por primera vez a la edad 13 años o menos y en promedio, el 6,7% había experimentado una intoxicación en ese rango de edad (ESPAD, 2019). En España la edad promedio de inicio en el consumo de alcohol es de 16,7 años, siendo la segunda sustancia psicoactiva tras el tabaco que antes empieza a consumirse (EDADES, 2019/2020) .

Como se ha visto a edades tempranas se inicia el consumo de alcohol, pero... ¿qué patrón de consumo se observa en los adolescentes?

El patrón que se observa con más frecuencia es un patrón intermitente y abusivo, denominado “consumo en atracón” o en inglés “binge drinking”. El Instituto Nacional sobre Abuso de Alcohol y Alcoholismo (NIAAA) define el consumo en atracón como la ingesta de alcohol en cantidades elevadas (40 g o más en mujeres y 60 g o más en hombres) durante periodos cortos de tiempo (habitualmente entre 2-4 h), manteniéndose un nivel de intoxicación igual o superior a 0,08 g/L de alcohol en sangre (NIAAA, no date). Para un adulto estándar, este patrón de abuso de alcohol corresponde a consumir 4 o más bebidas en mujeres y 5 o más en hombres en aproximadamente 2 horas. Si hablamos de jóvenes serían solo 3 bebidas para las mujeres y de 3 a 5 bebidas para los hombres. (NIAAA, no date).

La prevalencia de episodios de consumo excesivo de alcohol entre los jóvenes de 15 a 19 años en Europa, en países de ingresos altos como Australia, Canadá, Nueva Zelanda o Estados Unidos y en algunos países de América del Sur, como Argentina y Chile, es particularmente prevalente ($\geq 20\%$) (NIAAA, no date; World Health Organization, 2019) (Figura 1.2).

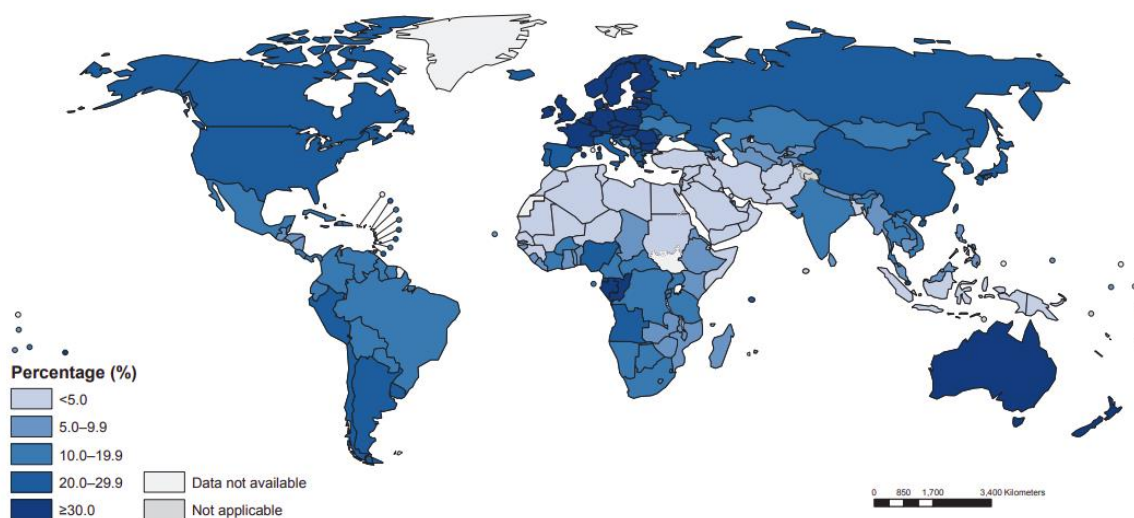
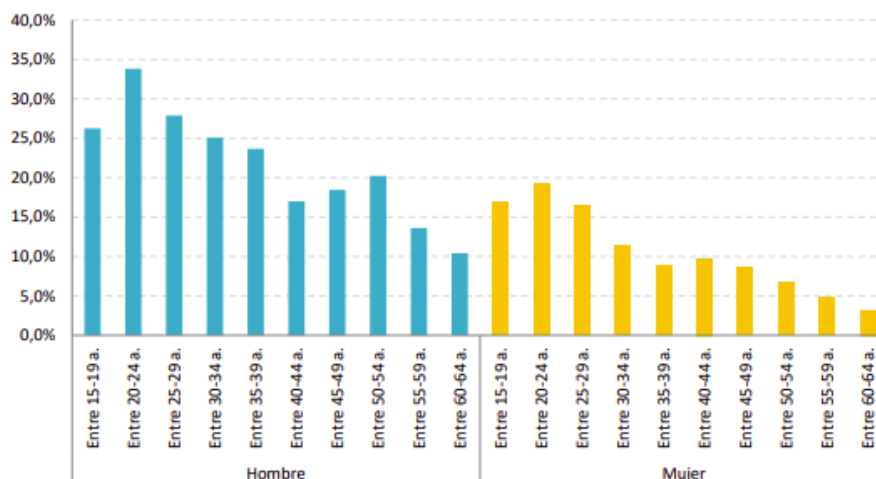


Figura 1.2. Prevalencia (%) de episodios de consumo excesivo de alcohol (HED) entre los jóvenes de 15 a 19 años, 2016. Fuente: *Global status report on alcohol and health 2018*, World Health Organization, 2019.

Este patrón de consumo es una preocupación entre todos los grupos de edad, pero si reparamos en jóvenes de 18 a 22 años, las tasas de consumo en atracón a pesar de haber disminuido en Estados Unidos siguen siendo altas. Según el National Survey on Drug Use and Health (NSDUH) de 2019, el 27,7% de las personas que no estaban matriculadas en la universidad a tiempo completo y el 33,0% de los estudiantes universitarios a tiempo completo en este grupo de edad informaron haber bebido en exceso en el último mes (NIAAA, no date). Si reparamos en Europa, uno de cada tres estudiantes de 16 años bebe cinco o más vasos de bebidas alcohólicas en una ocasión, al menos una vez al mes, y la mayoría beben en 5-6 ocasiones, y más de 1 de cada 10, sufren una intoxicación aguda en este tiempo (ESPAD, 2019). En España se observa que es un patrón de consumo que se da más en grupos de menor edad y la máxima prevalencia se registra en el grupo de 20 a 24 años en ambos sexos (33,8% hombres y 19,2% en mujeres) (Figura 1.3) (EDADES, 2019/2020).



FUENTE: OEDA Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES)

Figura 1.3. Prevalencia de consumo de alcohol en atracón (binge drinking) en los últimos 30 días en la población española de 15-64 años, según edad y sexo (%). Fuente: Encuesta sobre el alcohol y otras drogas en España (EDADES), 1995-2019/2020.

1.1.2 Efectos del consumo de alcohol en atracón

Entre las consecuencias de un consumo de alcohol en atracón encontramos efectos a corto plazo y a largo plazo.

En primer lugar, la tolerancia al alcohol depende del metabolismo de este, que difiere entre individuos ya que depende del peso corporal, del contenido de agua/peso corporal y del nivel de expresión de las enzimas que lo metabolizan (ADH y ALDH), que presentan diferencias de sexo y etnias (Aragón *et al.*, 2002; Serrano, 2002; Monti *et al.*, 2005).

Entre los síntomas a corto plazo en pacientes de urgencias con intoxicación aguda por etanol (concentración de alcohol en sangre 0,22 g/dL en chicas y 0,25 g/dL en chicos) se observan síntomas de incoordinación motora, desorientación, alteración del razonamiento y el habla (Pascual *et al.*, 2017). A pesar de que el 90% del alcohol ingerido es metabolizado por oxidación en el hígado, tanto el etanol como el acetaldehído, producto principal de su metabolismo, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Serrano, 2002) y producir efectos neurotóxicos (Guerra and Pascual, 2019).

Diferentes estudios realizados, tanto en humanos como en animales, demuestran las consecuencias del consumo de alcohol en atracón a largo plazo en una etapa de desarrollo cerebral, como es la adolescencia. Entre los efectos dañinos encontramos alteraciones estructurales en la sustancia gris y blanca (Squeglia, Jacobus, and Tapert, 2014), así como déficits en la memoria, bajo rendimiento académico (Hanson *et al.*, 2011), problemas de atención y orientación (Koskinen *et al.*, 2011), alteraciones en el aprendizaje visual (Sanhueza, García-Moreno and Expósito, 2011) y en actividades mentales complejas como las funciones ejecutivas (Goudriaan, Grekin and Sher, 2007), además de un aumento de la impulsividad (White *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha visto que el etanol es capaz de inducir una respuesta neuroinflamatoria, a través de la activación de los receptores TLR4. La acción del etanol sobre estos receptores conlleva a la activación de su cascada de señalización, que da lugar a la producción de mediadores inflamatorios y citocinas proinflamatorias (Blanco and Guerra,

2007; Fernandez-Lizarbe, Pascual and Guerri, 2009). Los receptores TLR4 forman parte de los receptores tipo Toll o *Toll-like receptors* (TLRs) del sistema inmune y se encuentran presentes en las células gliales del cerebro. Los TLRs de dichas células se activan frente a patógenos, restos celulares o estrés, produciendo inflamación (Brites and Fernandes, 2015). El ambiente proinflamatorio producido por el consumo de alcohol puede producir gliosis, desmielinización y daño cerebral (Alfonso-Loeches *et al.*, 2012; Montesinos *et al.*, 2015), causando las alteraciones cognitivas y de la conducta mencionadas anteriormente (Pascual *et al.*, 2011, 2015; Montesinos *et al.*, 2015, 2016).

Además, se han visto diferencias entre sexos tras una intoxicación aguda de alcohol, presentando las chicas adolescentes una mayor vulnerabilidad en la respuesta inflamatoria que los chicos, ya que la expresión de citocinas y quimiocinas en plasma a los mismos niveles de alcoholemia era más elevada, efectos que se correlacionan con una activación del receptor TLR4 a nivel plasmático y de cerebro, como se demuestra mediante el uso de animales deficientes funcionalmente en el receptor TLR4 (Pascual *et al.*, 2017). Al mismo tiempo, también se observaron diferencias entre sexos tras el consumo de alcohol crónico (Alfonso-Loeches *et al.*, 2012), en las que las hembras presentaban una mayor neurotoxicidad y daño cerebral que los machos adultos tratados de forma crónica con alcohol.

Los mecanismos por los que el alcohol es capaz de activar en cerebro tanto la respuesta inmune inflamatoria como al receptor TLR4 no están bien esclarecidos. Recientemente se han descrito nuevas funciones para un tipo de microvesículas, denominadas exosomas que actúan como mediadores intercelulares y como transportadores de sustancias de desecho (Frühbeis, Fröhlich and Krämer-Albers, 2012; Pascual, Ibáñez and Guerri, 2020).

1.2 Alcohol y vesículas extracelulares

1.2.1 Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares, que engloban a los exosomas y a las microvesículas extracelulares, son vesículas formadas a partir de la invaginación de la membrana de los cuerpos multivesiculares endosomales, en cuyo interior se pueden encontrar proteínas, ARN, microARN y lípidos, entre otras moléculas (Figura 1.4). Una vez que las vesículas alcanzan su maduración, son liberadas al espacio intercelular, por el cual viajan hasta ser captadas por otras células que internalizan su contenido (Frühbeis *et al.*, 2013; Perez-Gonzalez *et al.*, 2012). Participan en el control de las funciones fisiológicas entre las células, aunque recientemente también se ha demostrado su importancia como mecanismo de comunicación en situaciones de estrés o daño celular (Frühbeis, Fröhlich, and Krämer-Albers, 2012). Durante el trabajo el término exosoma hará referencia a los exosomas como tal y a las microvesículas extracelulares.

En un trabajo reciente llevado a cabo por nuestro grupo (Ibáñez *et al.*, 2019) se ha demostrado que el etanol es capaz de aumentar el número de vesículas extracelulares liberadas por células astrogliales y alterar su contenido en proteínas y microARNs relacionados con la respuesta inmune inflamatoria. Además, las vesículas extracelulares procedentes de células astrogliales tratadas con etanol pueden actuar propagando la neuroinflamación a las neuronas y comprometiendo su supervivencia. Estudios de los últimos años han demostrado la participación de estas microvesículas en la amplificación y el daño producido en enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson, entre otras (Su, H. *et al.*, 2021). Cabe destacar el pequeño tamaño y las características de las

vesículas extracelulares, que les permite su paso a través de la barrera hematoencefálica y los sitúan como una estrategia prometedora para identificar dianas terapéuticas y biomarcadores de trastornos neurológicos y de neuroinflamación (Pascual, Ibáñez, and Guerri, 2020) (Figura 1.5). De hecho, un estudio reciente (Ibáñez *et al.*, 2020) ha demostrado que las chicas y chicos adolescentes difieren en cuanto a los efectos del etanol asociados con el perfil de los microARNs procedentes de vesículas extracelulares plasmáticas relacionadas con la inflamación, y sugieren que las chicas adolescentes son más vulnerables que los chicos.

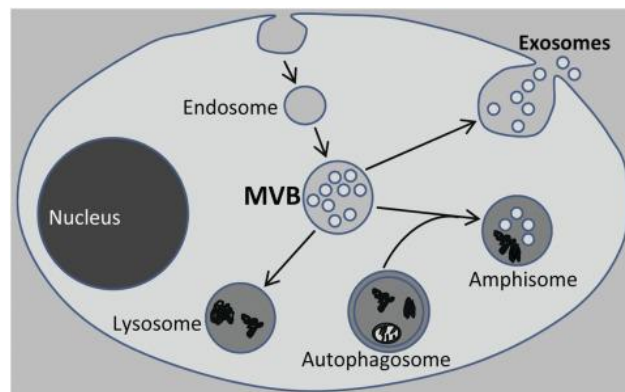


Figura 1.4. Formación de vesículas extracelulares (exosomas) por la fusión de cuerpos multivesiculares (MVB) con la membrana plasmática. Los MVB, también llamados endosomas tardíos, pueden fusionarse con lisosomas, con autofagosomas y con la membrana plasmática. Después de la fusión de MVB con la membrana plasmática, las ILV (vesículas intraluminales) de MVB se liberan como EV (vesículas extracelulares) y luego se denominan exosomas. Fuente: Skotland *et al.*, 2019.

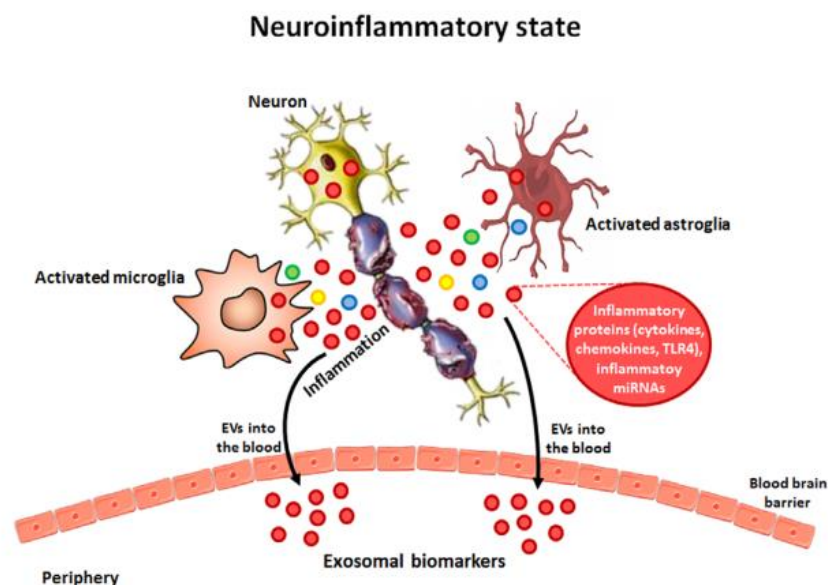


Figura 1.5. Liberación de exosomas por parte de las células astrogliales y microgliales tras una agresión neural como respuesta neuroinflamatoria. Después de una agresión neural, las células astrogliales y microgliales se activan liberando vesículas extracelulares que contienen proteínas inflamatorias, “misfolded” y miARN involucrados en una respuesta neuroinflamatoria que afecta la viabilidad de las neuronas. EV: vesículas extracelulares. Fuente: Pascual, Ibáñez, and Guerri, 2020.

1.2.2 Lípidos en las vesículas extracelulares

Los lípidos se definen como moléculas constituidas por un ácido alifático de cadena media y número par de átomos de carbono (de 4 a 30 átomos), ligados por un enlace éster, a veces amida o éter, a compuestos que tienen una función alcohol o más (esfingosina, alcoholes grasos superiores, etc). La presencia de largas cadenas hidrocarbonadas en la molécula de los lípidos les confiere la propiedad de ser insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos apolares (*lipid*, no date; M M i X, no date). Los lípidos exhiben una notable diversidad estructural, determinada por factores como la longitud de cadena variable, y transformaciones bioquímicas como oxidaciones, reducciones, sustituciones, transformaciones formadoras de anillos, así como modificaciones con residuos de azúcares y otros grupos funcionales de diferente origen biosintético. Esta variación en las estructuras de las moléculas de los lípidos es un reflejo de la diversidad funcional que presentan, siendo un grupo dispar y ubicuo con funciones clave en la fisiología y patología celular (Fahy *et al.*, 2011). Se denominan *lípidos simples* los que sólo contienen carbono, oxígeno e hidrógeno, y comprenden los triglicéridos, llamados grasas (grasa) o aceites (aceite) según sean sólidos o líquidos, las ceras (cera) y los ésteres de los esteroides (esterol); dentro de este último grupo, uno de los esteroides más conocidos es el colesterol. Por otro lado, los lípidos que contienen otros constituyentes en su molécula, tales como ácidos fosfóricos, ácido sulfúrico, bases nitrogenadas y azúcares se les denomina *lípidos complejos* o *lipoides*; comprenden los fosfolípidos (fosfolípido), los esfingolípidos (esfingolípidos) y los glicolípidos (glicolípidos) (*lipid*, no date; M M i X, no date).

Contrastando el caso de genes y proteínas, que se componen principalmente de combinaciones lineales de 4 ácidos nucleicos y 20 aminoácidos, respectivamente, las estructuras lipídicas son más complejas debido a la cantidad de diferentes transformaciones bioquímicas que ocurren durante su biosíntesis (Fahy *et al.*, 2011). No existen estimaciones confiables del número de compuestos lipídicos discretos en la naturaleza, debido a los desafíos técnicos de dilucidar las estructuras químicas, pero basándose en la cadena de acilo/alquilo y permutaciones de azúcar para glicerolípidos, glicerofosfolípidos y esfingolípidos, el número de especies moleculares de lípidos puede estimarse alrededor de 200.000 (Yetukuri *et al.*, 2008).

La estabilidad de las vesículas extracelulares en el entorno extracelular y la interacción de éstos con otras células están relacionadas con la composición lipídica de la membrana, por su implicación en la formación, liberación y función (Llorente *et al.*, 2013; Skotland, Sandvig, and Llorente, 2017). Por ejemplo, al realizar comparaciones entre los lípidos que forman parte de los exosomas y de los lípidos de las células de la línea PC-3 (cáncer de próstata), muestran un enriquecimiento de determinados lípidos en los exosomas. Este análisis puede ayudar a comprender la biogénesis de los exosomas, su estabilidad en el entorno extracelular y/o la interacción de los exosomas con otras células. De este modo, se pone de manifiesto la importancia de la lipidómica molecular cuantitativa para proporcionar conocimientos novedosos que nos ayudarán a comprender la estructura de la membrana y, potencialmente, conducirán a nuevas vías en el tratamiento y diagnóstico de diferentes patologías (Llorente *et al.*, 2013).

1.3 Ómicas

Las nuevas tecnologías han hecho posible obtener una gran cantidad de medidas moleculares dentro de un tejido o célula. Los campos científicos asociados con la medición de tales moléculas biológicas se denominan "ómicas" (Micheel *et al.*, 2012).

Entre los campos encontramos la proteómica, la transcriptómica, la genómica, la metabolómica, la lipidómica y la epigenómica, que corresponden a análisis globales de proteínas, ARN, genes, metabolitos, lípidos y ADN metilado o histonas modificadas en los cromosomas, respectivamente (Micheel *et al.*, 2012). La finalidad de estos estudios es interpretar mediciones moleculares mediante un modelo computacional para producir un resultado clínicamente procesable. Es decir, obtener una comprensión del sistema biológico en estudio y asociar las mediciones moleculares con un resultado clínico de interés, para desarrollar un modelo predictivo o pronóstico más preciso de una condición o enfermedad en particular (Micheel *et al.*, 2012). En los últimos años, surge la necesidad de nuevos métodos computacionales debido al papel que juegan en la resolución de problemas biológicos, la gran cantidad de datos que se están generando a partir de tecnologías de alto rendimiento y el aumento de la información accesible en las bases de datos biológicas. En función del tipo de dato ómico con el que trabajemos y dependiendo de los objetivos del estudio, encontramos diferentes estrategias de análisis.

1.3.1 Lipidómica en bioinformática

Los desarrollos en bioinformática generalmente han seguido los avances tecnológicos de la biología molecular, es por ello por lo que la bioinformática más extendida y desarrollada se encuentre en el área de la genómica, la primera disciplina ómica que abordaron los bioinformáticos. Actualmente están disponibles grandes cantidades de datos lipidómicos gracias a los avances en la espectrometría de masas, pero la identificación de biomarcadores y su interpretación biológica sigue siendo un desafío, ya que son escasos los recursos y las herramientas capaces de abordar este tipo de datos ómicos, siendo la bioinformática de lípidos una necesidad emergente (Niemelä *et al.*, 2009; Pauling and Klipp, 2016; Mohamed and Hill, 2021). Además de estas dificultades a la hora de trabajar con lipidómica encontramos la falta de una nomenclatura estandarizada y de anotaciones funcionales, que asocien a cada lípido su funcionalidad.

En los estudios de lipidómica, tanto dirigidos como no dirigidos, se utilizan protocolos experimentales similares que han sido reforzados por desarrollos recientes en plataformas analíticas modernas basadas en espectrometría de masas (MS) (Pati *et al.*, 2016). Como se muestra en la Figura 1.6, el primer paso en el laboratorio experimental es la extracción de los lípidos presentes en muestras biológicas. Después, el análisis por espectrometría de masas, el cual nos aporta información estructural y de intensidad que mediante métodos computacionales nos permite identificar y cuantificar los lípidos. Tras el procesamiento de estos datos procedemos a realizar los análisis estadísticos para llevar a cabo la identificación de biomarcadores y su caracterización funcional.

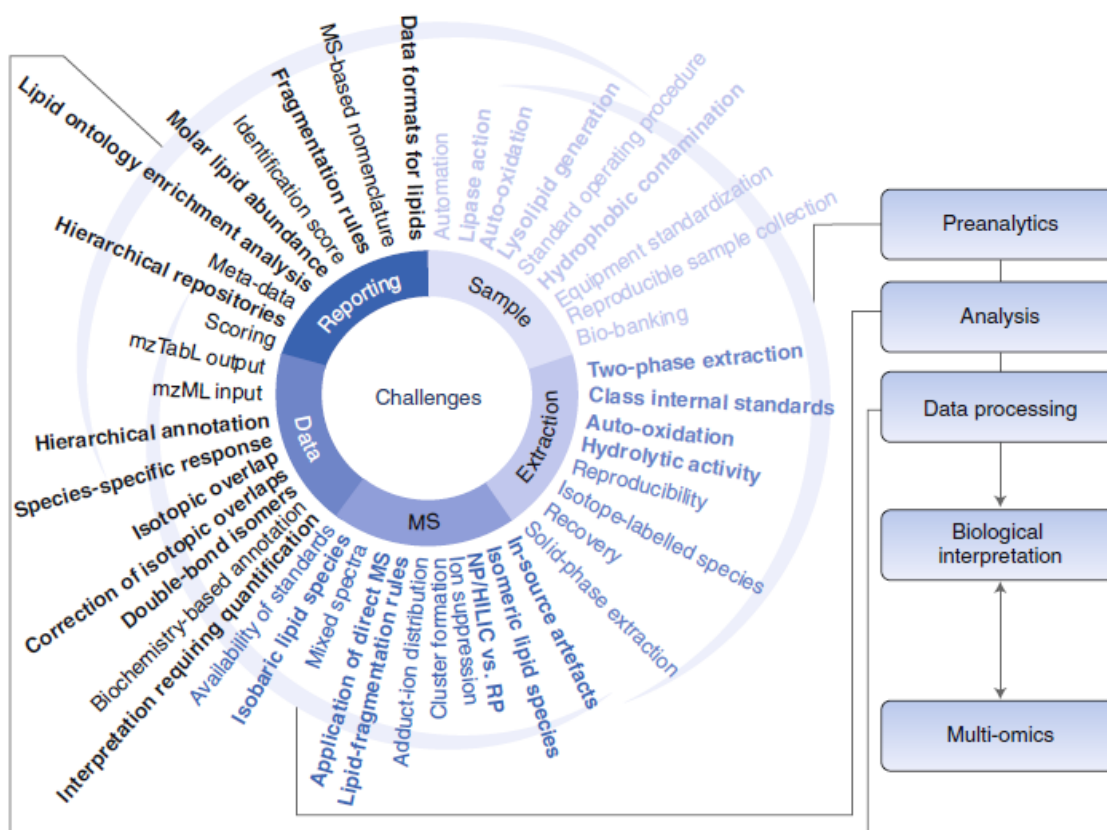


Figura 1.6. Flujos de trabajo de la lipidómica. Los términos en negrita son particularmente importantes. MS, espectrometría de masas; NP / HILIC, cromatografía fase normal / líquido de interacción hidrofílica; RP, fase inversa. Fuente: Lipidomics Standards Initiative Consortium, 2019.

1.3.1.1 Identificación de biomarcadores

Para los análisis bioinformáticos de lípidos se hace uso de herramientas y estrategias aplicadas en estudios genómicos, proteómicos y metabolómicos (Ransohoff, 2005; Broadhurst and Kell, 2007).

En la transcriptómica el primer paso consiste en un preprocesamiento de los datos, y entre las estrategias de análisis de datos posteriores más comunes encontramos (García García, 2016):

- *Análisis de expresión diferencial:* su objetivo es la identificación de genes o transcritos que varían su expresión entre los diferentes grupos experimentales.
- *Predicción de clases:* a partir de un conjunto de datos que sirven de entrenamiento para el modelo, con perfiles de transcripción diferentes entre las diferentes condiciones, es posible determinar un predictor supervisado que clasifique nuevas muestras.
- *Análisis de clúster:* su objetivo es el de agrupar las diferentes muestras o grupos de genes, a partir de un patrón de expresión común. Este tipo de análisis también se denomina clasificación no supervisada.

Estas estrategias son aplicables a la lipidómica.

1.3.1.2 Caracterización funcional

En el apartado anterior se describen diferentes estrategias de análisis mediante las cuales obtenemos listas de elementos biológicos de interés o una ordenación de todas estas unidades que aparecen en el estudio, siguiendo criterios estadísticos, biológicos o clínicos con relevancia para los investigadores. Por otra parte, existen bases de datos donde se registran anotaciones funcionales (funciones asociadas a unidades biológicas y que están incluidas en un vocabulario estructurado) que nos aportan información biológica que ayudan a interpretar los resultados obtenidos anteriormente (García García, 2016).

En el campo de la transcriptómica encontramos la base de datos Gene Ontology (GO) (Ashburner *et al.*, 2000), con anotaciones de procesos biológicos, funciones moleculares o componentes celulares que caracterizan a grupos de genes; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa and Goto, 2000), que proporciona información de interacciones moleculares; miRBase (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014), que contienen información relativa sobre miARNs. En la proteómica UniProt (Consortium and The UniProt Consortium, 2015) y en metabolómica RefMet (Fahy and Subramaniam, 2020).

A la hora de realizar análisis de las rutas en las que participan los lípidos generalmente se combinan datos de diferentes niveles, como la lipidómica, la transcriptómica y la proteómica (Yetukuri *et al.*, 2007). Es importante señalar que actualmente, aunque existen entradas para moléculas de lípidos específicas en bases de datos como LIPID MAPS (*LIPID MAPS® Lipidomics Gateway*, no date) y The Human Metabolome Database (HMDB) (*Human Metabolome Database*, no date), las rutas seleccionadas contienen predominantemente biología general de clases de lípidos, por lo tanto, la inferencia biológica actual en lipidómica se basa en evidencias experimentales o únicamente en las tendencias basadas en la clase de lípidos y el perfil de ácidos grasos (Koelmel *et al.*, 2017). También encontramos anotaciones en la base de datos RefMet (Fahy and Subramaniam, 2020).

Una vez tenemos los resultados procedentes de los experimentos y la información biológica de las bases de datos, se realiza la caracterización funcional de los resultados de estos análisis combinando ambos conocimientos. Entre las diferentes metodologías encontramos (García García, 2016):

- *Descripción de las funciones asociadas a un grupo de lípidos.* Conocer las funcionalidades de un grupo de lípidos que están diferencialmente expresados.
- *Análisis de Sobre Representación* (Al-Shahrour, Díaz-Uriarte and Dopazo, 2004; Al-Shahrour *et al.*, 2007). Determinar si las funciones o procesos biológicos conocidos están sobrerrepresentados en una lista de genes (u otras moléculas) derivada experimentalmente. Se comparan las funciones anotadas de este grupo con las funciones de otro grupo de referencia, evaluando estadísticamente la proporción de genes/lípidos asociados a una determinada función, pudiendo detectarse sobrerrepresentación de genes/lípidos asociados a dicha función. Tiene la limitación de que se estudia la lista específica de genes/lípidos procedentes de una selección realizada a partir de un punto de corte.
- *Lipid Set Enrichment Analysis (LSEA)*, basado en Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (Subramaniam *et al.*, 2005; Mohamed, Molendijk and Hill, 2020). Determinar si los lípidos/genes que participan en una misma función tienden a agruparse y a presentar patrones de expresión alta (sobreexpresados) o baja

(infraexpresados) en los diferentes grupos a estudiar. Se utiliza la lista completa de lípidos/genes del estudio y se ordenan según su nivel de expresión diferencial.

Como se ha dicho anteriormente la bioinformática más extendida y desarrollada se encuentra en el área de la genómica/transcriptómica, por ello los otros campos se basan e intentan aplicar sus metodologías siempre que sea posible.

1.3.1.3 Nomenclatura

Existen múltiples convenciones para la clasificación y nomenclatura de lípidos, además se pueden expresar en diferentes niveles según el grado estructural que se defina (carbonos y dobles enlaces, constituyentes de acilo graso, isómeros posicionales, posición de doble enlace, doble enlace cis o trans, la estequiometría) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Diferentes formas de anotar un mismo lípido según sus grados de resolución estructural. Fuente: Koelmel et al. 2017.

Resolución estructural	Anotación
Carbonos y dobles enlaces	PC(34:2)
Constituyentes de acilo graso	PC(16:0_18:2)
Isómeros posicionales	PC(16:0/18:2)
Posición de doble enlace	PC(16:0/18:2(10,12))
Doble enlace cis o trans	PC(16:0/18:2(10E,12Z))
Estequiometría	PC(16:0/18:2(10E,12Z)[R])

Para hacer frente a las enormes cantidades de datos de lípidos que genera y generará la comunidad científica, utilizarlos con un enfoque de “biología de sistemas” y facilitar la comunicación internacional, se precisa de una nomenclatura y clasificación estándar, y una plataforma común compatible con los requisitos informáticos (Fahy *et al.*, 2005). Debido a la complejidad de los nombres de los lípidos mediante la aplicación de las reglas para nombrar compuestos orgánicos establecidas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la Comisión de Nomenclatura Biológica de la IUPAC (IUPAC-IUB) propuso una convención de nomenclatura alternativa en 1967 y la amplió en 1978 (Koelmel *et al.*, 2017). En 2005 y 2009, la Clasificación Internacional de Lípidos y el Comité de Nomenclatura (ILCNC) definieron una nueva clasificación y nomenclatura de lípidos según las reglas IUPAC-IUB, la cual está disponible y se utiliza en la base de datos de LIPID MAPS (Koelmel *et al.*, 2017; Lisa, 2020). Pero los diferentes niveles de nomenclatura (Tabla 1.1) aún causan problemas al comparar herramientas de análisis, especialmente en la interpretación de datos o en ontologías basadas en modelado, como el análisis de enriquecimiento de conjuntos de lípidos (Izumi *et al.*, 2019).

2 Hipótesis y objetivos

Resultados recientes han demostrado diferencias entre sexos en el consumo de alcohol durante la adolescencia (Pascual *et al.*, 2017; Ibáñez *et al.*, 2020), siendo las chicas más vulnerables que los chicos a los efectos del alcohol al mostrar una mayor respuesta inflamatoria. Además, teniendo en cuenta el papel de los exosomas o vesículas extracelulares en la respuesta neuroinflamatoria inducida por el alcohol, así como la importancia de los lípidos exosomales (Llorente *et al.*, 2013; Skotland, Sandvig and Llorente, 2017), nuestra hipótesis es *demostrar si la intoxicación alcohólica presenta un papel relevante a nivel lipídico en las vesículas extracelulares plasmáticas procedentes de individuos adolescentes y su posible perfil diferencial por sexo.*

Para comprobar esta hipótesis, se formularon los siguientes objetivos específicos en el presente trabajo:

1. Análisis estadístico de la expresión de los lípidos presentes en las vesículas extracelulares procedentes de chicas y chicos tras una intoxicación alcohólica.
2. Búsqueda de diferencias entre sexos en el perfil de expresión lipídica de las vesículas extracelulares procedentes de plasma.
3. Análisis de los mecanismos biológicos implicados en los lípidos alterados por la intoxicación alcohólica en chicas y chicos adolescentes.

3 Material y métodos

3.1 Sujetos

Para llevar a cabo este trabajo, se trabajó en colaboración con el Dr. Miguel Marcos, del Departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca, España), ya que las muestras de plasma, procedentes de mujeres y hombres adolescentes fueron obtenidas en el Hospital Universitario de Salamanca. Nuestra muestra clínica incluyó a 18 adolescentes y adultos jóvenes que ingresaron en el Servicio de Urgencias del Hospital Universitario de Salamanca con intoxicación alcohólica aguda de moderada a grave (López-Moreno *et al.*, 2015). La intoxicación aguda por alcohol se definió por los signos y síntomas clínicos (incoordinación motora, marcha inestable, ralentización del razonamiento, dificultad para hablar, confusión o desorientación), niveles de alcohol en sangre (BAL) > 1 g/L y consumo de al menos cinco (50 g, hombres) o cuatro (40 g, mujeres) bebidas estándares durante las 6 horas antes de la admisión, aunque la cantidad total de bebida o el tiempo desde la primera y la última ingesta de etanol no se conocía exactamente para cada individuo. Los pacientes fueron excluidos si tenían alguna otra enfermedad aguda (por ejemplo, trauma o infección) o crónica, tomaban algún medicamento o si su análisis toxicológico urinario o los datos clínicos demostraron que habían consumido drogas ilegales (además del cannabis). Las características clínicas y analíticas de los individuos se muestran en la Tabla 3.1.

También se incluyeron en el estudio 18 controles sanos reclutados entre estudiantes de medicina y enfermería. Los controles no consumieron alcohol, aparte del consumo esporádico leve, no informaron consumo de alcohol durante las 72 horas previas a la extracción de sangre y no informaron episodios de consumo excesivo de alcohol durante los tres meses anteriores. Estos sujetos mostraron parámetros bioquímicos hematológicos y plasmáticos normales (Tabla 3.1) y no presentaban ninguna enfermedad crónica o aguda.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada participante. Se obtuvieron muestras de sangre de los pacientes al momento de la admisión para su uso en la atención estándar y también con fines de investigación. Estas muestras de sangre se utilizaron para determinar el BAL, el recuento sanguíneo, las pruebas de función hepática y para los análisis de lípidos en vesículas extracelulares. Las muestras se procesaron y analizaron para este estudio solo después de que los pacientes pudieron dar su consentimiento informado.

Durante todo el trabajo vamos a hablar de diferencias entre sexos y no género, ya que la distinción recae en términos biológicos, diferenciamos entre individuos XX y XY. El término género se usa para los roles sociales basados en el sexo de la persona (rol de género) o la identificación personal (identidad de género).

Tabla 3.1. Características de los sujetos del estudio en los cuatro grupos experimentales según sexo y tratamiento. Q1, primer cuartil. Q3, tercer cuartil. BAL, niveles de alcohol en sangre.

	Individuos sanos		Individuos intoxicación alcohólica	
	Chicos	Chicas	Chicos	Chicas
Edad (mediana)	22,56	19,78	20,67	19,78
Edad (Q1)	23	21	22	21
Edad (Q3)	21	18	19	18
BAL (g/l) (mediana)	0	0	2,54	2,00
BAL (g/l) (Q1)	0	0	2,80	2,20
BAL (g/l) (Q3)	0	0	2,30	1,80

3.2 Obtención de las vesículas extracelulares y aislamiento de la fracción lipídica

El aislamiento de las vesículas extracelulares a partir de las muestras de plasma se llevó a cabo en el laboratorio de Patología Celular y Molecular del Alcohol del Centro de Investigación Príncipe Felipe, siguiendo la metodología descrita en Ibáñez *et al.*, 2020. Para la obtención de la fracción lipídica de las microvesículas se utilizó un procedimiento modificado de la técnica de Folch. A continuación, se realizó la cuantificación de los distintos lípidos que se llevó a cabo en la Unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad de Alicante, utilizando para ello la técnica de Espectrometría de masas acoplada a cromatografía en fase líquida.

3.3 Procesamiento de los datos

Este estudio se inicia con los datos obtenidos en la Unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad de Alicante, a partir de la identificación y cuantificación de los distintos lípidos y su posterior normalización. El formato de los datos con el que se trabaja es similar al de un estudio de microarrays o RNAseq, donde en las filas se encuentran los valores de expresión para cada lípido y en las columnas las diferentes muestras.

Los datos se dividieron en dos grupos que se mantienen a lo largo del estudio dependiendo de la polaridad del modo de ionización utilizado durante la espectrofotometría de masas, modo iterativo negativo (lípidos negativos) y modo iterativo positivo (lípidos positivos). Se parte de 4 grupos experimentales (control hombre, control mujer, etanol hombre, etanol mujer) con 9 réplicas por grupo, es decir 36 muestras en total, y con 381 lípidos negativos y 276 lípidos positivos.

3.3.1 Unificación de la nomenclatura de los lípidos

Para cada lípido se unificó la nomenclatura, ya que en algunos casos encontrábamos lípidos identificados con el mismo nombre, pero con diferentes tiempos de retención, aunque similares (ejemplo: FA 19:0 RT:3.990, FA 19:0 RT:4.279, FA 19:0 RT:4.676, FA 19:0 RT:4.856), por lo que se consideraron el mismo lípido, con el objetivo de disponer de una medida única por lípido. Para ello se calculó la mediana a los valores de expresión. Se entiende como tiempo de retención el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima en el proceso de cromatografía.

3.3.2 Análisis exploratorio

Con los datos de expresión sin información duplicada y con las muestras distribuidas en los diferentes grupos de interés, se realizó un análisis exploratorio. El análisis exploratorio engloba todos los procedimientos empleados para analizar los datos e interpretar los resultados que se obtienen a partir de ellos (Tukey, 1962), con el fin de determinar la distribución de la expresión de las muestras, comprobar que no existen patrones anómalos y evaluar la calidad de los datos del estudio.

Los datos fueron evaluados mediante análisis de *clustering*, análisis de componentes principales (PCA) y diagramas de cajas:

- *Análisis de agrupamiento o Clustering y Análisis de Componentes Principales (PCA)*: el objetivo es observar la distribución de las muestras de los grupos experimentales e identificar posibles agrupaciones de las muestras en cuanto a los niveles de expresión de manera dependiente del sexo o de caso control o etanol. Se llevaron a cabo dos metodologías para el análisis de *clustering* utilizando la distancia euclídea y la distancia de correlación, para ver agrupaciones de los niveles de expresión de las muestras según el sexo o tratamiento (etanol-control) de los pacientes. El uso de dos tipos de distancias nos permitió ver las agrupaciones tanto a nivel de distancia “ordinaria” entre las muestras (distancia euclídea) como a nivel de las tendencias de expresión de las muestras (distancia de correlación).
- *Diagrama de cajas*: el objetivo es comprobar que no existen anomalías en la distribución de los datos. Se realizaron dos tipos de diagramas de cajas, en un primer lugar se representó un diagrama por muestra y, en segundo lugar, uno por lípido separando los cuatro grupos. En caso de encontrar alguna irregularidad se eliminó en la primera estrategia la muestra y en la segunda se analizó y valoró la eliminación de los valores atípicos, en inglés, *outliers*. Los valores atípicos son observaciones cuyos valores son muy diferentes a las otras observaciones del mismo grupo de datos que son ocasionados por errores de procedimiento, acontecimientos extraordinarios, causas no conocidas. Los datos atípicos distorsionan los resultados de los análisis, por esta razón hay que identificarlas y tratarlos de manera adecuada, generalmente excluyéndose del análisis (2.2 *Valores atípicos*, no date). Se consideró un dato atípico aquel valor que se encontraba por encima del del tercer cuartil (Q3) + 1,5 * IQR (rango intercuartílico) o por debajo del primer cuartil (Q1) - 1,5 * IQR (Glen, 2021). Este criterio permitió su identificación y exclusión del grupo de datos.

3.4 Análisis de expresión diferencial

En el análisis de expresión diferencial se evalúan las diferencias a nivel de expresión lipídica entre los diferentes grupos experimentales. Puesto que el objetivo del trabajo es identificar diferencias entre sexos debido al alcohol, los grupos surgieron de la combinación del factor “sexo” y del factor “tratamiento”, tal y como se puede ver en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Grupos de estudio para las comparaciones.

Sexo	Control	Etanol
Hombres	Control.Hombres	Etanol.Hombres
Mujeres	Control.Mujeres	Etanol.Mujeres

En este apartado se valoraron diferentes abordajes y finalmente se aplicaron dos métodos diferentes: modelos lineales mediante el paquete `limma` de bioconductor y un análisis de la varianza de dos factores y su interacción (ANOVA), con la finalidad de hacer una comparativa, ya que como se ha dicho en la introducción en este tipo de estudios no está tan consolidada la metodología como en otros campos de las ómicas.

En ambos casos se evaluaron:

- Efecto del sexo, mediante la comparación de las diferencias entre mujeres y hombres.
Ecuación del contraste: (*Mujeres - Hombres*)
- Efecto del tratamiento, mediante la comparación de las diferencias entre caso (etanol) y control.
Ecuación del contraste: (*Etanol - Control*)
- Efecto de la interacción del sexo y el tratamiento: comparación de las diferencias en mujeres debidas a la intoxicación por alcohol con las diferencias en hombres debidas a la intoxicación por alcohol.
Ecuación del contraste:
(*Etanol mujeres - Control mujeres*) vs. (*Etanol hombres - Control hombres*)

3.4.1 `limma`

Por una parte, se evaluaron los contrastes a través de los modelos lineales implementados en el paquete `limma` de Bioconductor (Ritchie *et al.*, 2015), el cual permite evaluar para cada lípido un contraste de medias de expresión definido en un modelo lineal, donde la variable respuesta es la expresión lipídica con la función `lmFit`. Se calcularon los coeficientes estimados y los errores estándares a partir de la matriz de contrastes y el modelo lineal `contrasts.fit`, y los estadísticos de la expresión diferencial con `eBayes`. Finalmente, se ajustó el *p-valor* mediante el método de Benjamini y Hochberg (BH) (Benjamini and Hochberg, 1995).

3.4.2 Análisis de la varianza (ANOVA)

Se evaluaron las comparaciones de interés mediante la función `aov` de R (*aov function - RDocumentation*, no date; Everitt, 1992), la cual realiza los contrastes para saber si existe alguna diferencia significativa entre la expresión media entre las diferentes condiciones experimentales, bajo la hipótesis nula de que todas las medias son la misma. Finalmente, se ajustó el *p-valor* mediante el método de Benjamini y Hochberg (BH) (Benjamini and Hochberg, 1995).

3.5 Caracterización funcional

Para este apartado se realizó una búsqueda exhaustiva de diferentes métodos para realizar una caracterización funcional, tanto en la parte de anotación como en el análisis estadístico. Entre las bases de datos y herramientas valoradas encontramos:

- LIPID MAPS (*LIPID MAPS*, no date):
 - LIPID MAPS® Lipidomics Gateway (*LIPID MAPS® Lipidomics Gateway*, no date)
 - LMSD: LIPID MAPS structure database (Sud et al., 2007)
- LIPEA: Lipid Pathway Enrichment Analysis (Cybernetics, no date; Acevedo *et al.*, 2018)
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kanehisa and Goto, 2000)
- paquete *lipidr* (Mohamed, Molendijk and Hill, 2020)
- paquete *MetaboAnalystR* (Pang *et al.*, 2021)
- LION/web (Molenaar *et al.*, 2019)
- RefMet: A Reference list of Metabolite names (Fahy and Subramaniam, 2020)
- Lipid Mini-On (Clair *et al.*, 2019)
- LipidBank (*LipidBank*, no date)

Tras valorar las diferentes herramientas/metodologías se decidió para este trabajo realizar un análisis de enriquecimiento funcional a través de Lipid Set Enrichment Analysis (LSEA), basado en Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (Montaner and Dopazo, 2010; Mohamed, Molendijk and Hill, 2020). El objetivo de este tipo de análisis es indicar cuál es la función biológica que hay detrás de un conjunto de lípidos que se han clasificado según su expresión diferencial. Para ello se ha asociado cada lípido con tres niveles de clasificación, con el objetivo de detectar la regulación preferencial de ciertas clases de lípidos a diferentes niveles. Primer nivel *super class*, que engloba a diferentes *main class* y esta engloba diferentes *sub class*. Para que la anotación fuera lo más estandarizada posible se utilizó la base de datos RefMet (Fahy and Subramaniam, 2020), la cual vimos que coincidía notablemente con la clasificación de LIPID MAPS, y nos basamos en esta anotación para completar de manera manual aquellos lípidos que no habían sido anotados. En algunos estudios extraen las clases directamente de los nombres de los lípidos, utilizando solo un nivel (Mohamed, Molendijk, and Hill, 2020).

En este apartado del trabajo se utilizaron los resultados de la expresión diferencial obtenidos con el método de *limma*. La razón es que *limma* matemáticamente se ajusta mejor al tipo de dato ómico con el que estamos trabajando y al obtener resultados similares a ANOVA, como veremos en el siguiente apartado, decidimos quedarnos con *limma*. No se utilizó desde un principio solo *limma* ya que al ser un abordaje nuevo para nosotros se quiso comparar en el análisis de expresión diferencial ambas metodologías.

La anotación de RefMet se ejecutó en el cluster del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). Está compuesto por 44 nodos de computadora, con hasta 600 CPU y una memoria RAM acumulada de 11 TeraBytes. Utiliza un sistema de almacenamiento de archivos distribuido llamado Lustre, que cuenta con una capacidad de 1 PetaByte, con capacidad para almacenar y analizar datos provenientes de proyectos biomédicos.

El resto de los programas se ejecutaron en un ordenador portátil (HP laptop) con un procesador Intel® Core™ i5-7200U 2.50GHz y 7,7 GiB de memoria. Este procesador tiene 2 núcleos y 4 procesadores lógicos. Plataforma: x86_64-pc-linux-gnu (64-bit). Ubuntu 18.04.5 LTS

En ambos casos se utilizó el lenguaje R version 3.6.3 (2020-02-29)

El código lo podemos encontrar en el repositorio de acceso abierto Zenodo a través del enlace: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5068523> o con el siguiente código QR:



Los repositorios de acceso abierto como Zenodo forman parte de la filosofía FAIR/Opendata, donde se fomenta la cooperación y se destaca el potencial de compartir datos e información de los resultados de las investigaciones.

4 Resultados

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en este trabajo, siguiendo el orden establecido en el apartado anterior. Para facilitar la lectura del gran volumen de resultados, se muestran las figuras de mayor relevancia, pudiéndose encontrar el resto publicadas en [Zenodo](https://zenodo.org/), accediendo a través del enlace: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5068523> o con el siguiente código QR:



4.1 Procesamiento de los datos

4.1.1 Unificación de la nomenclatura de los lípidos

Tras la detección de lípidos duplicados (identificadores similares), se unificaron y sus niveles de expresión se resumieron a través de su mediana, obteniendo un número final de 330 lípidos negativos y 247 lípidos positivos (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Número de lípidos iniciales y finales, tras la fase de procesamiento.

	Número inicial	Número final
Lípidos negativos	381	330
Lípidos positivos	276	247

4.1.2 Análisis exploratorio

4.1.2.1 Lípidos negativos

En el análisis de *clustering* podemos observar como las muestras de mujeres control suelen agruparse utilizando tanto la distancia euclídea como la de correlación, al igual que algunas muestras de etanol hombre (Figura 4.1).

En el PCA (Figura 4.2) también se observa este agrupamiento de las muestras control mujer.

Las muestras no presentan anomalías en la distribución de los datos, tal como indican los diagramas de cajas (Figura 4.3 A), en cambio, sí que existen valores atípicos en los grupos experimentales por cada lípido (Figura 4.3 B). Como el número de valores atípicos no era excesivo, tras consensuar con la responsable de la investigación experimental, se decidió eliminarlos para evitar un ruido extra que produjera alteraciones en los análisis posteriores.

Tras la eliminación de los valores atípicos se repitió el *clustering* por distancia euclídea y podemos ver como las muestras se agrupan por grupo control y etanol (Figura 4.1).

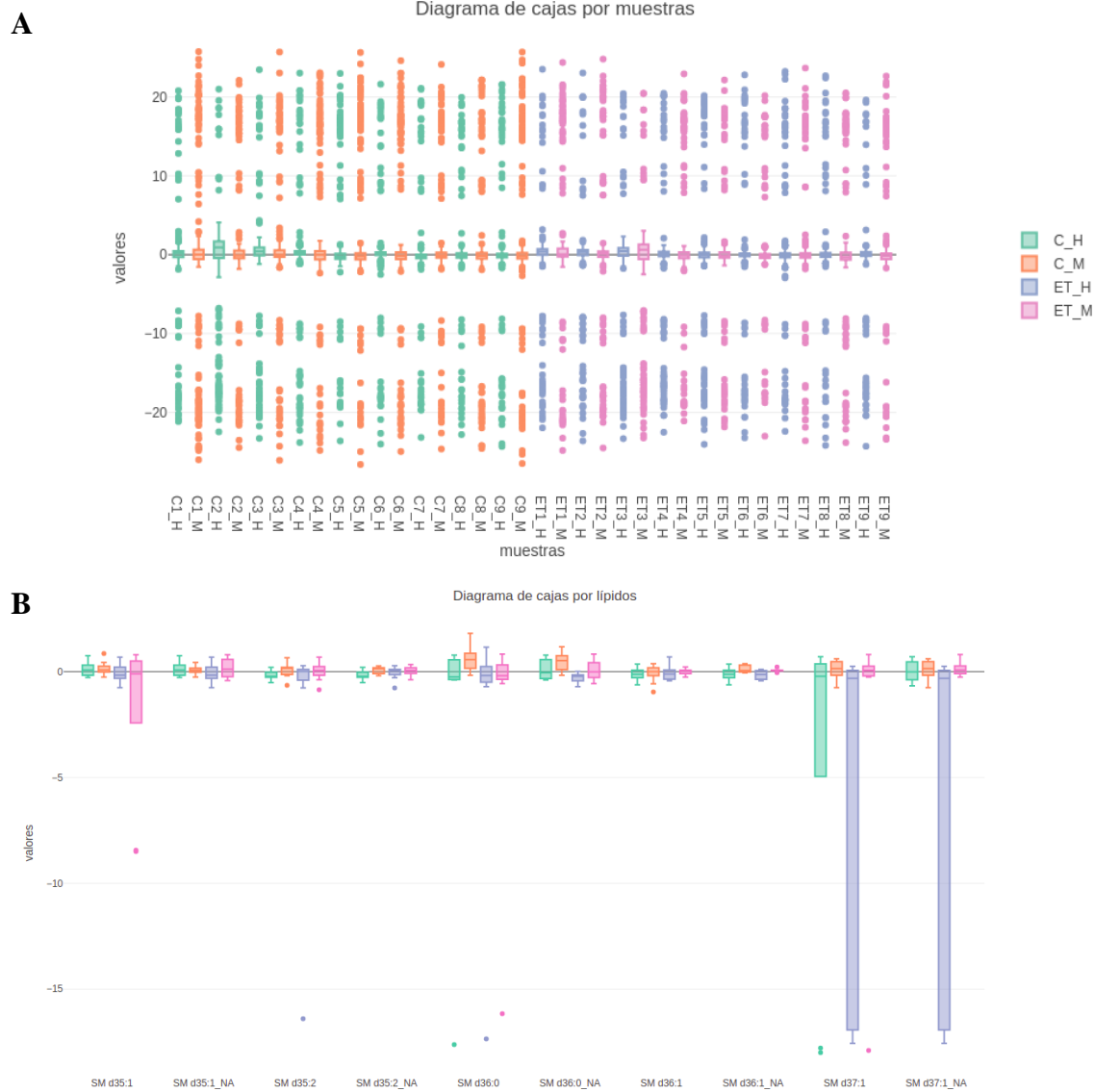


Figura 4.3. A. Diagrama de cajas por muestra en lípidos negativos. La mediana de todos los grupos experimentales es similar y no vemos ninguna distribución anómala. **B. Ejemplo de diagrama de cajas de cada lípido por grupo experimental de 5 lípidos** previa eliminación de valores atípicos, se representa en el eje de abscisas el nombre del lípido, y tras la eliminación de los valores atípicos, se representa en el eje de abscisas el nombre del lípido añadiendo el sufijo *_NA*. Podemos ver cómo en algunos casos se observan valores atípicos. *C_H*: control hombre, *C_M*: control mujer, *ET_H*: etanol hombre, *ET_M*: etanol mujer.

4.1.2.2 Lípidos positivos

En el análisis de *clustering* podemos observar cómo en general las muestras se separan entre hombres y mujeres. Las muestras de mujeres control suelen agruparse en los clusterings con ambas distancias (Figura 4.4).

En el PCA (Figura 4.5) vemos una agrupación marcada entre sexos y una agrupación menos marcada entre etanol control dentro del mismo sexo (las gráficas del Anexo son interactivas por lo que podemos seleccionar qué grupos representar para una mejor visualización).

La muestra etanol hombre número 9 presenta anomalías en la distribución de los datos como se observa en el diagrama de cajas (Figura 4.6 A). Además, si nos fijamos tanto en el *clustering* de distancia euclídea como en el PCA (Figuras 4.4 y 4.5) esta muestra se representa alejada de las demás (las gráficas del Anexo son interactivas por lo que podemos identificar las muestras). Por ello, tras consensuar su alta variabilidad se decidió eliminarla del estudio. Por otro lado, al igual que en los lípidos negativos, se observaron valores atípicos en los grupos experimentales por cada lípido (Figura 4.6 B) y tras su evaluación, se decidió eliminarlos para evitar alteraciones en los análisis posteriores. A continuación, se repitió el *clustering* de distancia euclídea observándose una separación clara entre sexos y pequeñas agrupaciones por etanol-control (Figura 4.4).

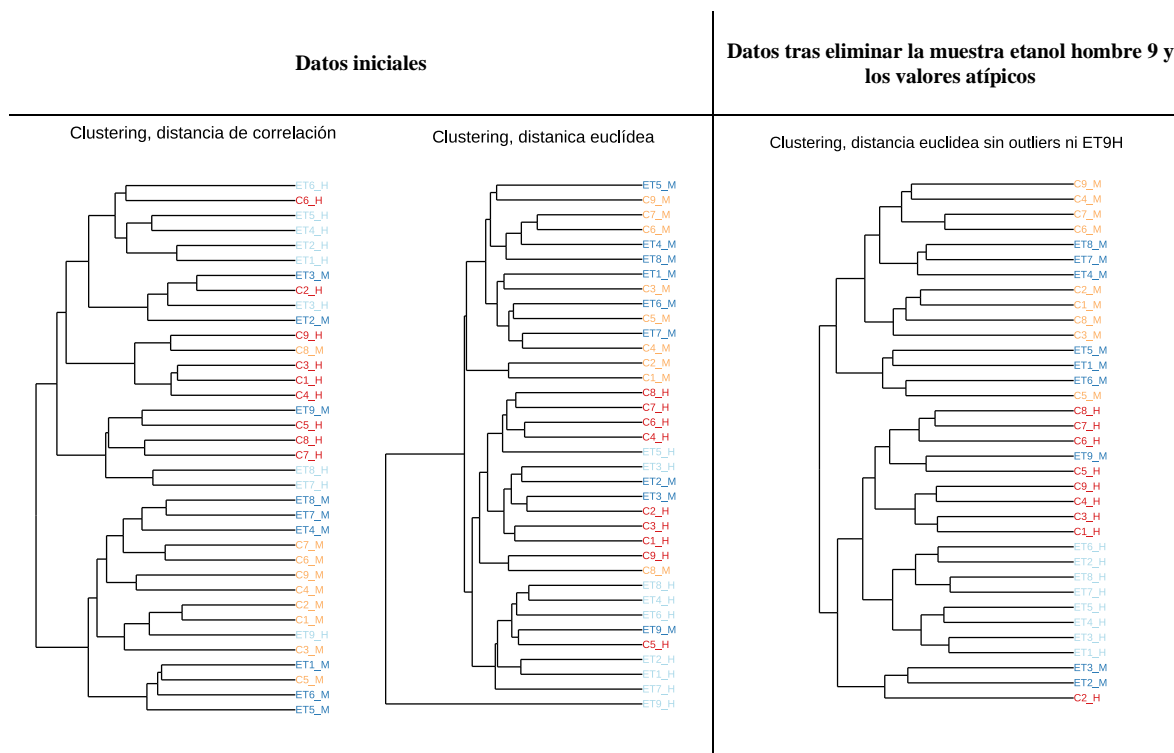


Figura 4.4. *Clustering de las muestras de lípidos positivos. Izquierda distancia de correlación, centro distancia euclídea y derecha distancia euclídea tras eliminar los valores atípicos. Con los datos iniciales vemos como las muestras de mujeres se agrupan, al igual las de hombre. Esta distribución se hace más notable tras eliminar los valores atípicos, además podemos ver pequeñas agrupaciones distribuidas por grupos control y etanol. Hay que destacar en la distancia euclídea como la muestra etanol hombre número 9 se separa notablemente del resto de muestras. Nota: control mujer, control hombre, etanol mujer, etanol hombre.*

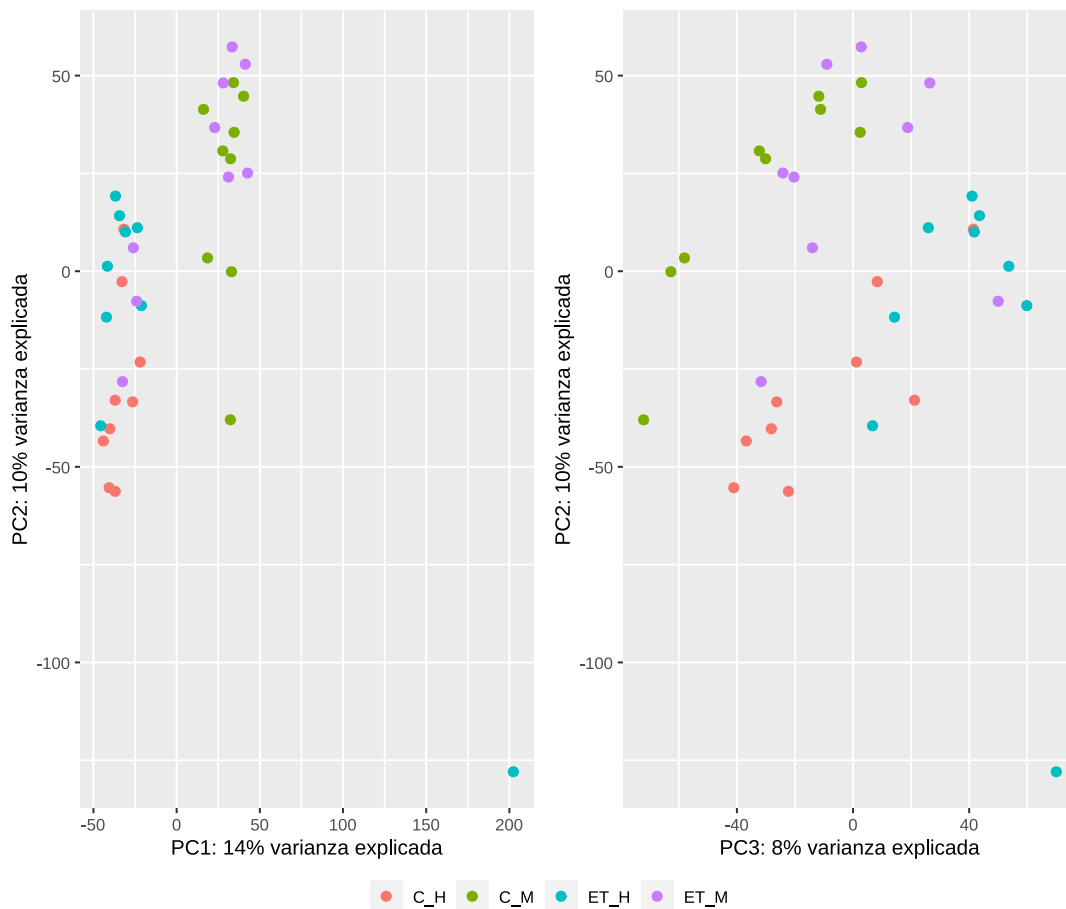


Figura 4.5. PCA de las muestras de lípidos positivos. Las muestras se agrupan por sexo. Además, podemos ver dentro de estas agrupaciones una leve distribución por tratamiento. Hay que destacar una muestra hombre etanol que siempre aparece alejada del resto de muestras (derecha parte inferior). C_H: control hombre, C_M: control mujer, ET_H: etanol hombre, ET_M: etanol mujer.



Figura 4.6. A. Diagrama de cajas por muestra en lípidos positivos. Se observa como la muestra etanol hombre número 9 destaca sobre el resto por su distribución, que difiere del resto de muestras.

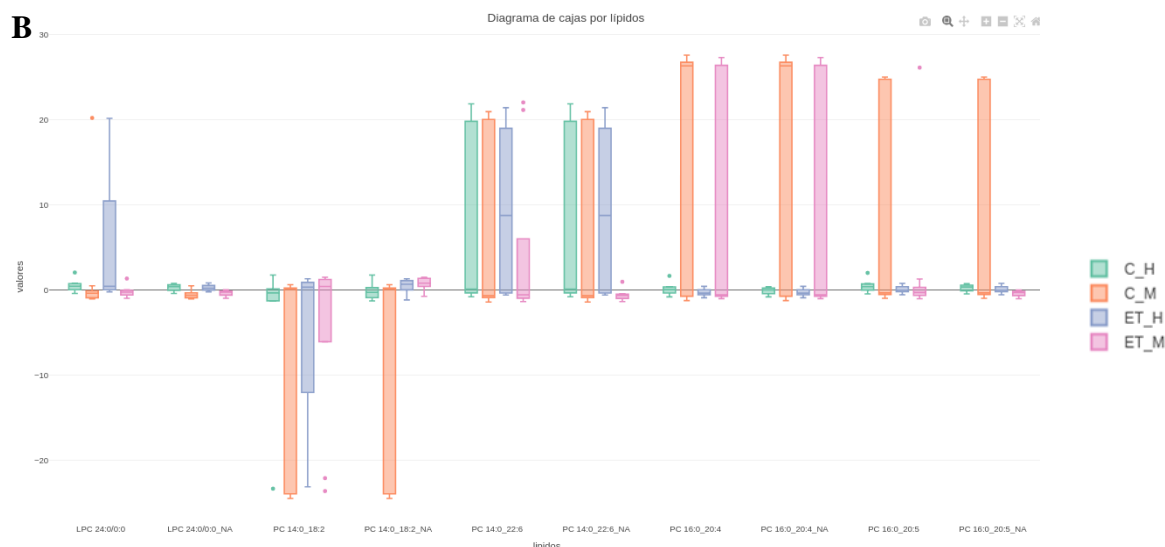


Figura 4.6. B. Ejemplo de diagrama de cajas de cada lípido por grupo experimental de 5 lípidos previa eliminación de valores atípicos, se representa en el eje de abscisas el nombre del lípido, y tras la eliminación de los valores atípicos, se representa en el eje de abscisas el nombre del lípido añadiendo el sufijo *_NA*. C_H: control hombre, C_M: control mujer, ET_H: etanol hombre, ET_M: etanol mujer.

4.2 Expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial proporciona la detección de los lípidos más expresados en cada uno de los grupos de interés. Estos resultados serán utilizados en las siguientes fases de la estrategia de análisis.

4.2.1 Limma

La Tabla 4.2 muestra el número de lípidos significativos expresados de forma diferencial en cada contraste (*p*-valor ajustado por BH < 0.05) en el análisis con el paquete *limma*. Los resultados se muestran agrupados en Up si el logaritmo de la magnitud de cambio (logFC) es mayor a 0, o en Down si el logFC es menor a 0. Podemos observar como en todos los contrastes obtenemos más de un lípido expresado diferencialmente, siendo en el sexo donde más lípidos obtenemos.

Tabla 4.2. Resumen de los resultados significativos del análisis de expresión diferencial con Limma. En todos los contrastes obtenemos más de un lípido expresado diferencialmente. Los resultados se muestran agrupados en Up si el logaritmo de la magnitud de cambio (logFC) es mayor a 0, o en Down si el logFC es menor a 0 y en general se distribuyen equitativamente. Hay que destacar que es en el contraste de sexo donde más lípidos se expresan diferencialmente.

	(Mujeres - Hombres)			(Etanol - Control)			Interacción (Etanol mujeres - Control mujeres) vs. (Etanol hombres - Control hombres)		
	Down	Up	Total	Down	Up	Total	Down	Up	Total
Lípidos negativos	60	43	103	19	16	35	13	9	22
Lípidos positivos	78	30	108	8	8	16	2	0	2

4.2.2 Análisis de la varianza (ANOVA)

La Tabla 4.3 muestra el número de lípidos significativos expresados de forma diferencial en cada contraste (p -valor ajustado por BH < 0.05) en el análisis de la varianza.

Tabla 4.3. Resumen de los resultados significativos del análisis de expresión diferencial ANOVA. En todos los contrastes obtenemos más de un lípido expresado diferencialmente. Hay que destacar que es en el contraste de sexo donde más lípidos se expresan diferencialmente.

	(Mujeres - Hombres)	(Etanol - Control)	Interacción (Etanol mujeres - Control mujeres) vs. (Etanol hombres - Control hombres)
Lípidos negativos	122	53	22
Lípidos positivos	116	18	2

4.2.3 Evaluación de los métodos

El número de lípidos significativos obtenidos con ambas metodologías es similar en la mayoría de los contrastes (Tabla 4.4). Para comparar los resultados entre ambas, se identificaron los lípidos que eran comunes en los métodos (Figura 4.7), y comprobamos que la mayoría de los lípidos significativos se comparten. Además, ANOVA suele englobar todos los resultados identificados por limma. En el Anexo podemos ver qué lípidos no comparten.

Tabla 4.4. Resumen de los resultados significativos en ambas metodologías. Los resultados obtenidos son similares en ambas metodologías, siendo el número mayor en ANOVA excepto en la interacción que son idénticos.

	(Mujeres - Hombres)		(Etanol - Control)		Interacción (Etanol mujeres - Control mujeres) - (Etanol hombres - Control hombres)	
	limma	ANOVA	limma	ANOVA	limma	ANOVA
Lípidos negativos	103	122	35	53	22	22
Lípidos positivos	108	116	16	18	2	2

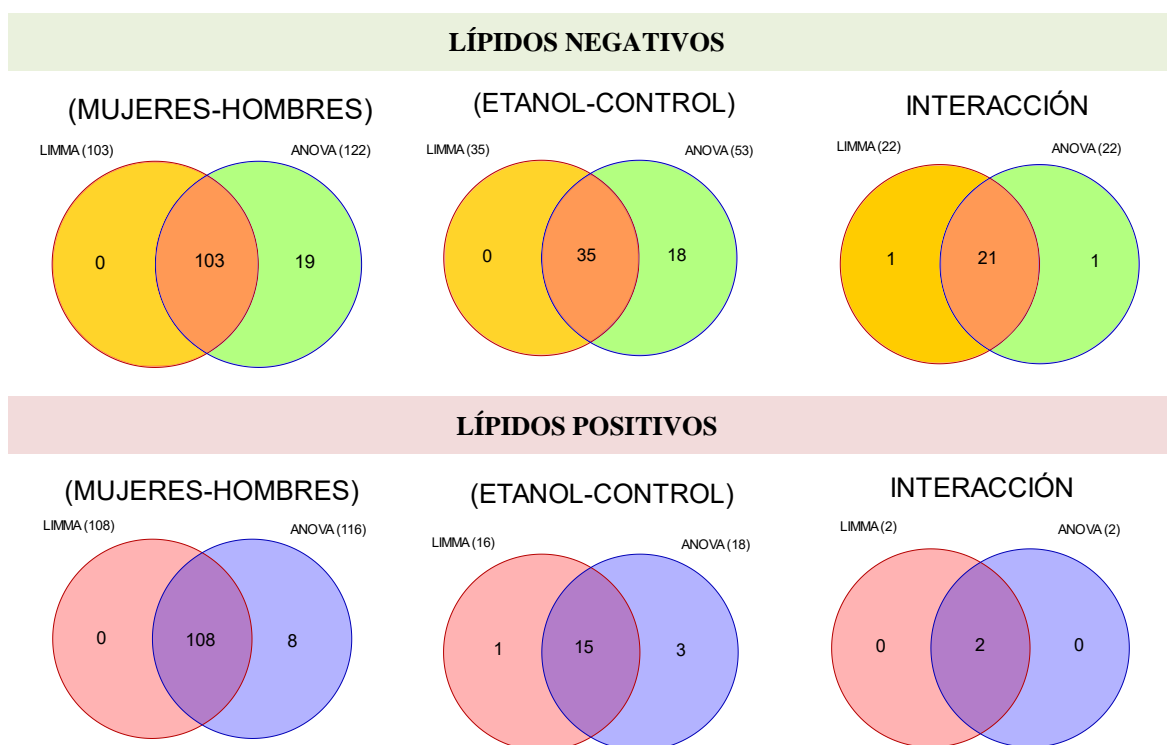


Figura 4.7. Comparación de los resultados significativos entre ambas metodologías. Diagrama de Venn donde cada círculo representa los lípidos significativos en cada metodología, el solapamiento representa los lípidos que comparten. En general ANOVA presenta más lípidos significativos y engloba a los obtenidos con Limma.

4.3 Caracterización funcional

4.3.1 Anotación funcional

Tras la anotación mixta (automática y manual) de los diferentes niveles de clases de lípidos basada en la base de datos RefMet (Fahy and Subramaniam, 2020) y LIPID MAPS (Sud *et al.*, 2007) se obtuvieron los siguientes resultados representados en las Figuras 4.8 y 4.9 para los dos niveles superiores (*super class*, *main class*), y resumidos en las Tablas 4.5 y 4.6 para los tres niveles (*super class*, *main class*, *sub class*). En los lípidos negativos vemos tres *super class* y en los lípidos positivos cinco, aunque existe mayor variabilidad dentro de cada *super class* en negativos, es decir más tipos de *main class* y *sub class*.

La anotación con MetaboAnalystR (Pang *et al.*, 2021) que relaciona los lípidos con componentes KEGG (Kanehisa and Goto, 2000), la base de datos HMDB (*Human Metabolome Database*, no date) y PubChem (PubChem, no date) se incluye en los [Anexos](#). Como se puede observar está incompleta y en algunos casos es errónea, por ello decidimos no hacer uso de ellas.

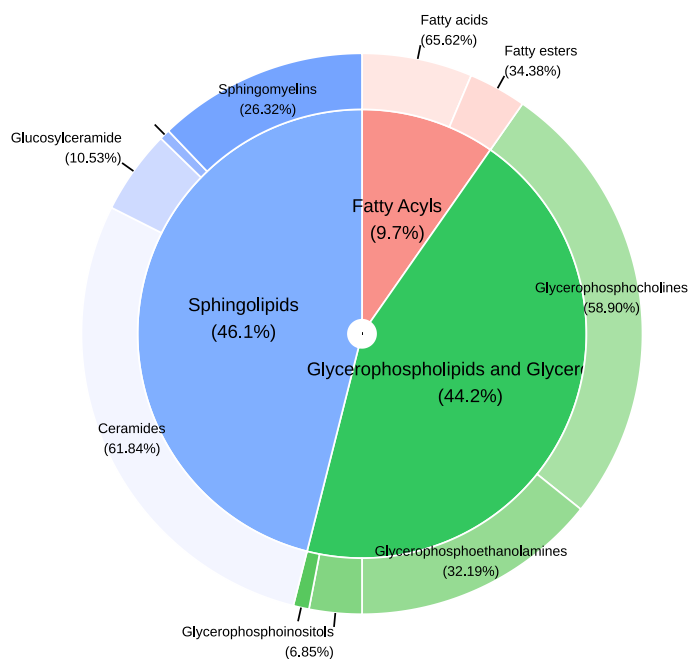


Figura 4.8. Clasificación de todos los lípidos negativos en diferentes niveles de agrupación funcional: super class (interior) y main class (exterior). El porcentaje en la super class representa el número de lípidos que representa cada super class en el total de lípidos. Lo valores mostrados para las main class indican el porcentaje de estas con respecto a la super class correspondiente.

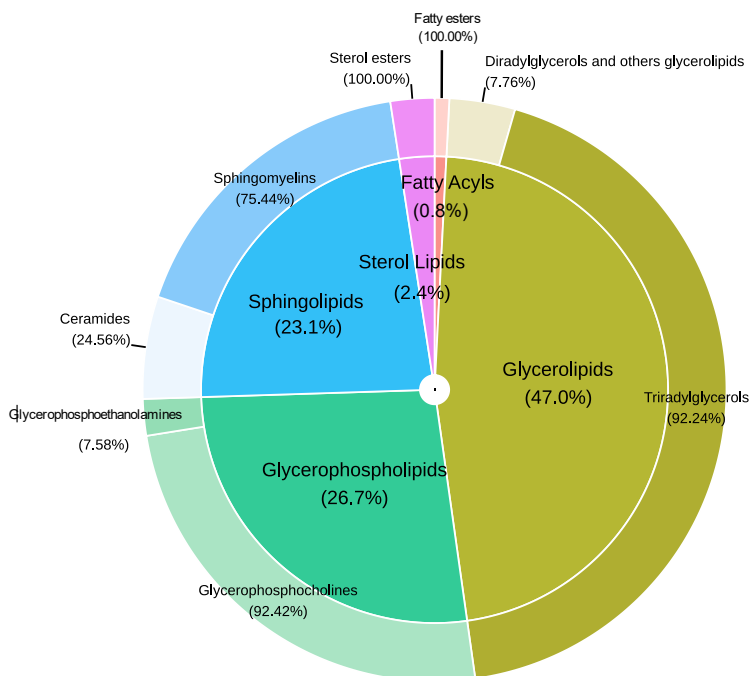


Figura 4.9. Clasificación de todos los lípidos positivos en diferentes niveles de agrupación funcional: super class (interior) y main class (exterior). El porcentaje en la super class representa el número de lípidos que representa cada super class en el total de lípidos. Lo valores mostrados para las main class indican el porcentaje de estas con respecto a la super class correspondiente.

Tabla 4.5. Clasificación por niveles de todos los lípidos negativos. A la derecha de cada clase se indica el número de lípidos que contiene.

-LÍPIDOS NEGATIVOS-

SUPER CLASS		MAIN CLASS		SUB CLASS	
Fatty Acyls	32	Fatty acids	21	Unsaturated FA	21
		Fatty esters	11	FAHFA	11
Glycerophospholipids and Glycerolipids	146	Glycerophosphoinositols	10	PI and OxPI	10
		Glycosylidradylglycerols and Glycerophosphoglycerols and Glycerophosphates	3	PA and PG and SQDG	3
		Glycerophosphocholines	86	PC	43
				PC-O and OxPC-O	31
				LPC	12
Glycerophosphoethanolamines	47	PE-O	19		
		PE and LPE	28		
Sphingolipids	152	Sphingomyelins	40	SM	40
				Cer_AS	6
		Ceramides	94	Cer_ADS	17
				Cer_AP	11
				Cer_NDS	35
				Cer_NP and Cer_EODS	3
				Cer_NS	22
		Glycosphingolipids	2	SHexCer	2
		Glucosylceramide	16	HexCer_NDS	11
HexCer_NS and HexCer_AP	5				
<i>Total</i>	<i>330</i>		<i>330</i>		<i>330</i>

Tabla 4.6. Clasificación por niveles de todos los lípidos positivos. A la derecha de cada clase se indica el número de lípidos que contiene.

-LÍPIDOS POSITIVOS-

SUPER CLASS		MAIN CLASS		SUB CLASS	
Fatty Acyls	2	Fatty esters	2	CAR	2
Glycerolipids	116	Triradylglycerols	107	TAG	107
		Diradylglycerols and others glycerolipids	9	DAG and DGTS	9
Glycerophospholipids	66	Glycerophosphocholines	61	PC	43
				LPC	18
		Glycerophosphoethanolamines	5	PE	5
Sphingolipids	57	Sphingomyelins	43	SM	43
		Ceramides	14	Cer_NS	14
Sterol Lipids	6	Sterol esters	6	Chol. esters	6
<i>Total</i>	<i>247</i>		<i>247</i>		<i>247</i>

4.3.2 Análisis de enriquecimiento funcional

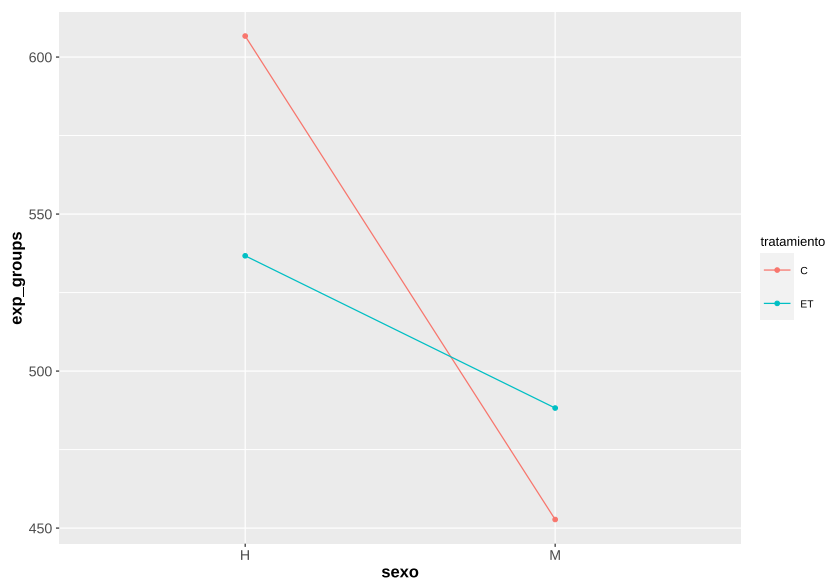
Con el análisis de enriquecimiento funcional a través de Lipid Set Enrichment Analysis (LSEA), obtuvimos clases significativas en los tres niveles (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Resultados de las diferentes clases significativas del LSEA. Para el sexo un valor de LOR positivo se interpreta como sobrerrepresentado en mujeres y un valor negativo en hombre. En el tratamiento un valor de LOR positivo se interpreta como sobrerrepresentado en etanol y negativo en control. Para la interacción un valor positivo se interpreta describiendo lo observado en el gráfico de medias, en este caso, sobrerrepresentado en hombres control y en mujeres etanol.

	SEXO (Mujeres - Hombres)		TRATAMIENTO (Etanol - Control)		INTERACCIÓN (Etanol mujer - Control mujer) vs. (Etanol hombre - Control hombre)	
	GROUP	LOR	GROUP	LOR	GROUP	LOR
SUPER CLASS	Sphingolipids	0,45119	Sphingolipids	-0,27073	Fatty Acyls	0,52658
	Glycerophospholipids and Glycerolipids	-0,31523	Glycerophospholipids and Glycerolipids	0,26282		
MAIN CLASS	Sphingomyelins	0,98180	PC-O and OxPC-O LPC	-0,61812 0,80482	Fatty acids	0,67455
	Glycerophosphoethanolamines	-0,51938				
SUB CLASS	SM	0,98180				
SUPER CLASS	Sphingolipids	0,37459				
	Glycerolipids	0,67455				
	Sphingomyelins	0,49135				
MAIN CLASS	Triacylglycerols	-0,36934				
	PC	0,43284				
SUB CLASS	SM	0,49135				
	TAG	-0,36934				

Para interpretar los resultados de la interacción se realizaron gráficos de medias, en los que se determinan los niveles medios de expresión en cada uno de los 4 grupos experimentales definidos por el sexo y el tratamiento. Comprobamos como la *super class Fatty Acyls* está sobrerrepresentada en hombres control respecto a hombres etanol y ocurre lo contrario en el caso de las mujeres, donde está sobrerrepresentada en mujeres etanol respecto a mujeres control (Figura 4.10 A). Concluimos que está sobrerrepresentada en hombres control y en mujeres etanol. Lo mismo ocurre en el caso de la *main class Fatty acids* (Figura 4.10 B).

A Super class Fatty Acyls



B Main class Fatty Acids

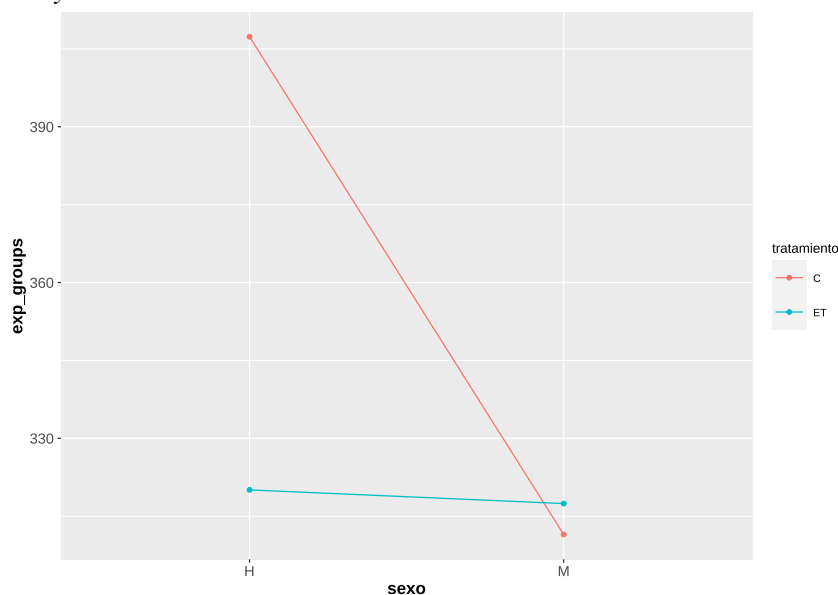


Figura 4.10. Gráficos de interacción para la *super class FattyAcyls* y *main class Fatty acids* significativa en lípidos negativos para el contraste de interacción. H: hombre, M: mujer, C: control, ET: etanol. Los valores de Fatty Acyls y Fatty Acids están más expresados en hombres control, pero en situación de etanol están más expresados en mujeres. Observamos interacción ya que las líneas se cruzan y vemos que la línea roja (control) se sitúa por encima en el caso de hombres, pero en las mujeres es la línea azul (etanol).

5 Discusión

Resultados previos muestran que el alcohol aumenta la liberación de vesículas extracelulares y su contenido en moléculas inflamatorias (proteínas y microARNs) en células astrogliales de corteza cerebral, y que estas vesículas extracelulares pueden comprometer la viabilidad neuronal (Ibáñez *et al.*, 2019). Puesto que las vesículas extracelulares son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica podrían utilizarse como buenos biomarcadores del daño inflamatorio en el consumo de alcohol. De hecho, hemos demostrado que las chicas adolescentes tras una intoxicación alcohólica presentan en las vesículas extracelulares plasmáticas mayor cantidad de microARNs asociados con una respuesta inflamatoria que los chicos intoxicados con alcohol (Ibáñez *et al.*, 2020). El presente trabajo estudia el contenido lipídico de las vesículas extracelulares plasmáticas de chicas y chicos adolescentes tras una intoxicación alcohólica, en el que se observa que el alcohol es capaz de alterar de manera diferencial el contenido lipídico de las vesículas extracelulares plasmáticas de chicas y chicos adolescentes. Además, la caracterización funcional muestra que existen clases de lípidos (*main class Fatty Acids* y su correspondiente *super class Fatty Acyls*) más representadas en el grupo de chicas con intoxicación alcohólica, y que estos lípidos están relacionados con la respuesta inmune inflamatoria.

Evidencias recientes muestran que las vesículas extracelulares poseen un mayor enriquecimiento en colesterol, esfingomielinas, glucoesfingolípidos y fosfatidilserina en comparación con las células precursoras (Skotland *et al.*, 2019). Estos lípidos no solo presentan una función estructural en las membranas vesiculares, también poseen un papel muy importante en la formación de las vesículas, su liberación al ambiente extracelular y su internalización en las células de los tejidos diana (Skotland *et al.*, 2019). Además, hay que destacar el papel de los lípidos vesiculares como excelentes biomarcadores no invasivos para el diagnóstico y el pronóstico de enfermedades, ya que circulan por fluidos corporales como sangre, saliva u orina (Skotland, Sandvig and Llorente, 2017; Lazar *et al.*, 2018). Asimismo, como se ha indicado anteriormente pueden atravesar la barrera hematoencefálica convirtiéndose en buenos candidatos como biomarcadores para los trastornos cerebrales, como enfermedades neurodegenerativas o neuroinflamatorias (Pascual, Ibáñez and Guerri, 2020; Skotland *et al.*, 2020). Por ello, en los últimos años el área de la lipidómica de las vesículas extracelulares ha estado en auge, como se puede observar en la Figura 5.1, aunque si la comparamos con la genómica y transcriptómica vemos que el interés científico por los lípidos de los vesículas extracelulares y los procesos en los que están involucrados aún es incipiente (Donoso-Quezada, Ayala-Mar and González-Valdez, 2021).

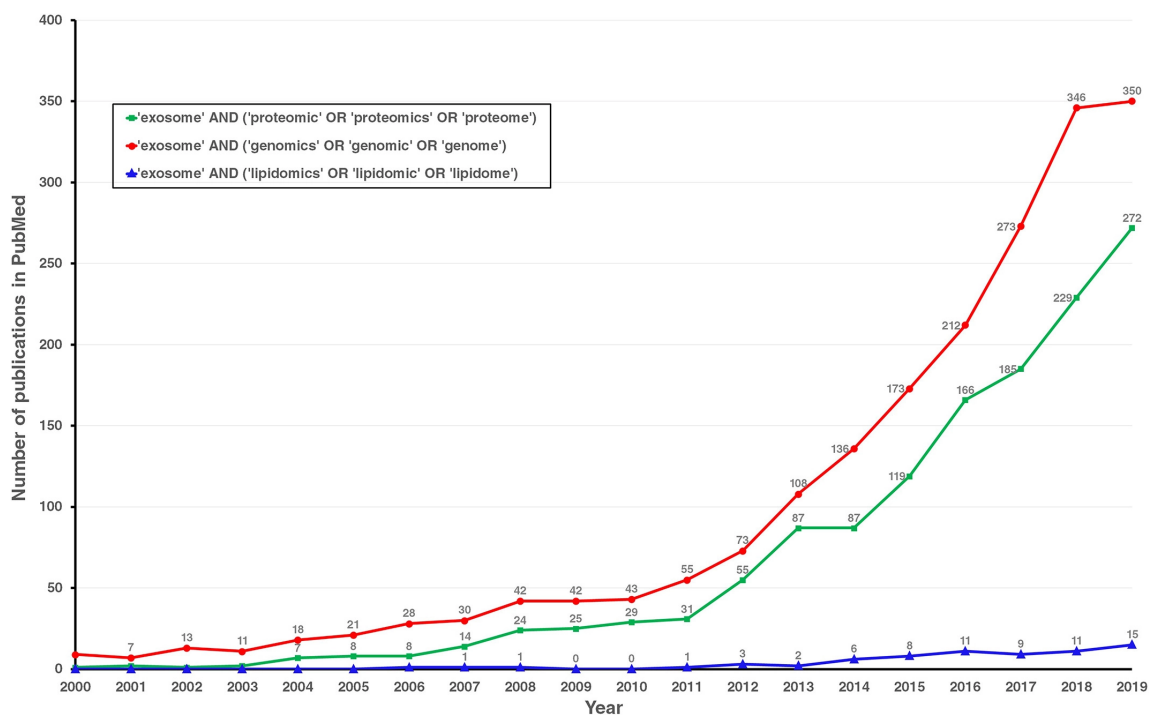


Figura 5.1. Número de publicaciones entre 2000 y 2019 en PubMed relacionadas con genómica, proteómica o lipidómica de vesículas extracelulares. Los términos de búsqueda fueron "exosome" AND "proteomic" OR "proteomics" OR "proteome" (verde); "exosome" AND "genomic" OR "genomics" OR "genome" (rojo); "exosoma" AND "lipidomic" OR "lipidomics" OR "lipidome" (azul). Fuente: (Donoso-Quezada, Ayala-Mar and González-Valdez, 2021).

Entre los niveles de clasificación que encontramos sobrerrepresentados en los diferentes contrastes vemos la *super class Sphingolipids*, en español esfingolípidos. Son componentes estructurales importantes de las membranas celulares y actualmente se reconocen como moléculas de señalización (Colombaioni and Garcia-Gil, 2004). Recientemente, varios estudios han destacado el papel fundamental de los esfingolípidos en la regulación neuroinflamatoria, induciendo la expresión de varios mediadores inflamatorios que afectan directamente a las células del sistema nervioso central. Además, se han visto evidencias de su participación en trastornos neuroinflamatorios, como Alzheimer y Parkinson (Assi *et al.*, 2013; Davies, Fassbender and Walter, 2013; Lee, Jin and Bae, 2020). Esta *super class* aparece sobrerrepresentada en chicas. Este hecho se relaciona con la mayor predisposición de las chicas a una respuesta inflamatoria tras una intoxicación alcohólica aguda, puesto que presentan en plasma una mayor cantidad de citocinas, mediadores inflamatorios y microARN asociados con la respuesta inflamatoria que los chicos adolescentes tras una intoxicación alcohólica (Pascual *et al.*, 2017; Ibáñez *et al.*, 2020). Por otro lado, en el contraste etanol-control aparece sobrerrepresentada en el grupo control. Lo esperado en este caso sería ver esta clase más representada en una situación de intoxicación alcohólica, ya que se ha visto en varios estudios que desencadena una respuesta neuroinflamatoria (Guerri and Pascual, 2019; Ibáñez *et al.*, 2019). Por ello, es un punto importante en los próximos estudios. No obstante, también es conocida la implicación de los esfingolípidos en la transducción de señales de estímulos extracelulares y su participación en eventos como proliferación, diferenciación y apoptosis. Además, se está empezando a descubrir el papel de los microdominios enriquecidos con esfingolípidos en la modulación de los canales iónicos y en la transducción de señales que conducen a la proliferación, diferenciación y apoptosis o a enfermedades (Colombaioni and Garcia-Gil, 2004).

En mujeres encontramos la *main class Glycerophosphoethanolamines*, en español glicerofosfoetanolamines, sobrerrepresentada. En Su *et al.*, 2021 estudiaron las vesículas extracelulares derivadas del cerebro observando un aumento significativo de los niveles de esta *main class* en aquellas vesículas provenientes de la corteza frontal del cerebro con Alzheimer. En mujeres también vemos sobrerrepresentada la *sub class SM* y su correspondiente *main class Sphingomyelins*, en español esfingomielinas. Como pertenecen a la *super class Sphingolipids* se les asocia con la respuesta neuroinflamatoria. Asimismo, las esfingomielinas, en asociación con el colesterol, forman microdominios de membrana comúnmente llamados balsas lipídicas, las cuales influyen en la fluidez de la membrana y en el tráfico de proteínas, regulando así la neurotransmisión y el tráfico de receptores (Coliva *et al.*, 2020). La otra *sub class* que encontramos sobrerrepresentada en mujeres es PC, en español fosfatidilcolina. El enriquecimiento de esfingomielina (SM) en las membranas de las vesículas extracelulares podría originarse a partir de balsas lipídicas de la membrana plasmática, y también a expensas de la fosfatidilcolina (PC) a través de la actividad de la esfingomielina sintasa (Subra *et al.*, 2007). Estas balsas lipídicas son fundamentales para el ensamblaje del receptor TLR4 durante la exposición a lipopolisacáridos (LPS) (Lee *et al.*, 2001; Cuschieri *et al.*, 2007). La sobrerrepresentación de estas *main class* y *sub class* en mujeres podría estar relacionada con la formación de balsas lipídicas y la activación del receptor TLR4 a nivel plasmático y de cerebro. De hecho, se ha demostrado que el alcohol en células astrogliales en cultivo actúa sobre las balsas lipídicas, favoreciendo la dimerización del receptor TLR4 y posterior activación de su cascada de señalización (Pascual-Lucas *et al.* 2014). Además, en Pascual *et al.*, 2017 se ha demostrado que las chicas tras una intoxicación alcohólica muestran en plasma una mayor expresión del ARNm del receptor TLR4 que las chicas control, mientras que los chicos con intoxicación alcohólica no presentaron cambios. Por lo tanto, estos resultados se asocian con que el alcohol en las chicas adolescentes puede activar al receptor TLR4 y su cascada de señalización, aumentando la respuesta inflamatoria, produciendo un mayor daño neural a nivel de cerebro y alteraciones cognitivas (Montesinos *et al.*, 2015, 2016).

Hay que destacar la *sub class LPC*, lisofosfatidilcolina, sobrerrepresentada en el grupo etanol. Existen diversos estudios que destacan la relación de este lípido con la respuesta inmune (Law *et al.*, 2019; Donoso-Quezada, Ayala-Mar and González-Valdez, 2021). Induce la secreción de IFN- γ y TNF- α , activa macrófagos, polariza la activación de los macrófagos hacia el fenotipo M1, activa las células B e induce la diferenciación de células T reguladoras (nTregs) a través de la expresión de Foxp3 y la producción de TGF- β 1. Asimismo, en las células neuronales se relaciona con el deterioro de la barrera del endotelio en la microvasculatura cerebral y con la inflamación inducida, media la pérdida de pericitos e induce la desmielinización de oligodendrocitos. La sobrerrepresentación de esta *sub class* en el grupo etanol y las funciones con las que se relaciona podría ampliar el conocimiento de estudios como (Rubio-Araiz *et al.*, 2017), donde se estudió la alteración de la integridad de la barrera hematoencefálica en el cerebro alcohólico *post mortem*. Se concluyó que el deterioro de la barrera hematoencefálica inducido por etanol no era evidente en ratones TLR4-KO expuestos a un protocolo de etanol similar a un atracón, sugiriendo la participación de la señalización de TLR4 en el mecanismo subyacente que conduce a la interrupción de de la barrera hematoencefálica. LPC no solo participa en el mecanismo de respuesta inflamatoria sino también se relaciona con el deterioro de la barrera hematoencefálica.

En controles las *sub class PC-O* (eterfosfatidilcolina) y *OxPC-O* (eterfosfatidilcolina oxidada) aparecen sobrerrepresentadas. Estudios revelan que los éter lípidos pueden modular la liberación de vesículas extracelulares, así como cambiar su composición.

Además, se relacionan con la fusión con otras membranas y con la estabilidad en el espacio extracelular (Phuyal *et al.*, 2015; Skotland *et al.*, 2019). Esta sobrerrepresentación en controles no implica necesariamente un hecho destacable, ya que se puede interpretar como un funcionamiento idóneo en un estado control.

Por otro lado, en los lípidos negativos se obtiene una *main class* y su *super class* correspondiente representada diferencialmente, *Fatty Acyls* (ácidos grasos) y *Fatty Acids* (ácidos grasos). Ambos niveles están sobrerrepresentados en hombres control, pero sobrerrepresentados en mujeres etanol. Los ácidos grasos pueden influir en la inflamación a través de una variedad de mecanismos, incluida la acción a través de la superficie celular y los receptores/sensores intracelulares que controlan la señalización celular inflamatoria y los patrones de expresión génica (Calder, 2011). Algunos efectos de los ácidos grasos sobre las células inflamatorias parecen estar mediados o al menos asociados con cambios en la composición de los ácidos grasos en las membranas celulares. Se pueden incorporar a los fosfolípidos de las membranas de las células inflamatorias manteniendo su fluidez e influyendo en la formación de la balsa de lípidos. Además, pueden influir en la señalización celular, que conduce a una expresión génica alterada y en el patrón de producción de mediadores de lípidos y péptidos. Los ácidos grasos no esterificados pueden actuar directamente sobre las células inflamatorias a través de los “receptores de ácidos grasos” superficiales o intracelulares; estos últimos pueden incluir factores de transcripción como los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR). Se ha demostrado que en la respuesta neuroinflamatoria desencadenada por el consumo excesivo de alcohol se activa la vía TLR4-NF- κ B que provoca una disminución en la función de PPAR suprimiendo su actividad antiinflamatoria (Flores-Bastías and Karahanian, 2018). La sobrerrepresentación en chicas etanol de *Fatty Acids* podría estar relacionada con una mayor expresión del receptor TLR4 en estas balsas lipídicas y con la activación inducida por el alcohol (Pascual *et al.*, 2017), como ya se ha comentado anteriormente para la SM. Por otro lado, se ha visto que algunos ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) presentes en pescados (n-3 ácidos grasos) cuando son consumidos en cantidades suficientemente altas alteran la composición de las membranas de células inflamatorias, desencadenando una actividad antiinflamatoria (Calder, 2011). Posiblemente la presencia de ácidos grasos de estructura similar a estos podrían estar sobrerrepresentado en el caso de hombres control.

En relación a la *super class Glycerophospholipids* y *Glycerolipids*, en español glicerofosfolípidos y glicerolípidos, que está sobrerrepresentada en los grupos macho (comparativa sexo) y en etanol (comparativa tratamiento) no se ha establecido con seguridad una función concreta y parece ser un grupo bastante heterogéneo.

Por último, hay que destacar las limitaciones que nos hemos encontrado al realizar este trabajo, que se presentan tanto en la lipidómica como en el campo de las vesículas extracelulares. Por un lado, en Skotland *et al.*, 2019 enfatizan que el campo de las vesículas extracelulares se ha desarrollado exponencialmente durante la última década, como hemos visto en la Figura 1.5, sin tener un consenso claro sobre los enfoques metodológicos óptimos. Esto ha causado confusión en la comunidad científica y, en algunos casos, los resultados pueden haber sido malinterpretados o estar basados en métodos de purificación insatisfactorios. Por otra parte, el abordaje de la lipidómica es un reto. A pesar de que las tecnologías modernas de espectrometría de masas proporcionan lecturas cuantitativas para una amplia variedad de muestras de lípidos, muchos estudios no informan de concentraciones absolutas de lípidos y difieren enormemente en metodologías, flujos de trabajo y presentación de datos. Por lo tanto, se alienta a los investigadores que trabajen en lipidómica, a participar en la iniciativa de estándares lipidómicos (Lipidomics

Standards Initiative) (Lipidomics Standards Initiative Consortium, 2019) con el objetivo de desarrollar estándares comunes que permitan la reproducibilidad de los experimentos y ayuden a la consolidación de esta ómica emergente.

Estos problemas han sido reflejados a la hora de realizar el trabajo, ya que a diferencia de otros campos como la genómica o la transcriptómica, donde ya existen estrategias asentadas con procesos de bioinformática estandarizados, se ha debido de realizar una búsqueda y valoración de metodologías. En el proceso se ha podido comprobar la falta de unificación de la nomenclatura que impedía combinar diferentes herramientas, a pesar de la existencia de conversores; pocas API¹ disponibles, muchas de ellas en fase de desarrollo; y una anotación funcional incompleta. En otros estudios destacan la falta de herramientas actuales con el potencial para extraer conjuntos de datos de lipidómica públicos y la no integración en los análisis estadísticos de una homogeneización de la nomenclatura a pesar de estar disponible en algunas herramientas de anotación (Mohamed, Molendijk and Hill, 2020).

A pesar de todo ello, en este trabajo se ha observado que en los últimos años están surgiendo diversos recursos para los análisis de expresión diferencial y caracterización funcional (Acevedo *et al.*, 2018; Clair *et al.*, 2019; Molenaar *et al.*, 2019; Fonseka *et al.*, 2021; Mohamed and Hill, 2021; Pang *et al.*, 2021). En el momento que se estandaricen las distintas nomenclaturas de lípidos, se podrán conectar las diferentes herramientas, mejorando su interoperabilidad y produciéndose un importante avance en el procesamiento, análisis e interpretación de los datos en estudios lipidómicos en Biomedicina.

En el camino hacia una medicina personalizada nos encontramos con que a pesar de que en muchas patologías, como las enfermedades autoinmunes (Lockshin, 2005), los desórdenes psicológicos (Green, Flash and Reiss, 2019), algunos tipos de cáncer (Pérez-Díez *et al.*, 2021) y enfermedades como la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Català-Senent *et al.*, 2021) también existen diferencias entre sexos, las mujeres en general están infrarrepresentadas en la investigación biomédica (Kim, Tingen and Woodruff, 2010; Lee, 2018). Muchas investigaciones no incorporan la variable sexo en el estudio y los resultados se extrapolan a ambos sexos sin una justificación completa, pudiendo causar enormes pérdidas económicas y muertes no deseadas (Lee, 2018). Dotar a la investigación biomédica de esta perspectiva es esencial, así como el análisis de los resultados de forma específica al sexo, ya que estas diferencias entre hombres y mujeres afectan a los biomarcadores que presenta cada sexo (a la hora de diagnosticar una enfermedad o su severidad, por ejemplo), o a la respuesta a medicamentos y terapias (Kim, Tingen and Woodruff, 2010).

Por tanto, podemos concluir que este tipo de abordaje ha permitido una nueva caracterización en los estudios relacionados con los mecanismos que subyacen a uno de los problemas más graves de la sociedad, como es el consumo abusivo de alcohol. El enfoque de diferencias de sexo puede proporcionar información relevante que será útil en el desarrollo y aplicación de la medicina personalizada. Además, los lípidos de las vesículas extracelulares podrían ser buenos candidatos a ser biomarcadores y nos pueden ayudar a explicar los mecanismos que subyacen a la respuesta neuroinflamatoria tras una intoxicación aguda.

¹ API: Interfaz de programación de aplicaciones.

6 Conclusiones

1. Existen lípidos en las vesículas extracelulares expresados diferencialmente entre chicas y chicos adolescentes, independientemente de la presencia o ausencia de alcohol en cuerpo.
2. Existen lípidos en las vesículas extracelulares expresados diferencialmente entre adolescentes controles y adolescentes tras una intoxicación alcohólica, independientemente del sexo.
3. Existen desigualdades entre los lípidos que se expresan de manera diferencial entre los grupos etanol y control en chicas frente a los que se expresan de manera diferencial entre los grupos etanol y control en chicos.
4. Hay clases de lípidos más representadas en los diferentes grupos experimentales.
5. En chicas tras intoxicación alcohólica se expresan clases de lípidos relacionadas con la respuesta neuroinflamatoria.
6. Los lípidos en las vesículas extracelulares son candidatos a ser buenos biomarcadores no invasivos y nos pueden ayudar a explicar los mecanismos que subyacen a la respuesta inflamatoria tras una intoxicación aguda.
7. El diseño y ejecución de la estrategia bioinformática desarrollada abre una nueva vía para detectar y caracterizar las diferencias de sexo mediante la lipidómica.
8. Tanto la lipidómica como el estudio de las vesículas extracelulares son campos relativamente recientes que están adquiriendo importancia en los últimos años, por ello aún no están tan consolidados como otras ómicas o abordajes.

7 Referencias

- 2.2 *Valores atípicos* (no date). Available at: https://www.uv.es/webgid/Descriptiva/22_valores_atpicos.html
- Acevedo, A. *et al.* (2018) ‘LIPEA: Lipid Pathway Enrichment Analysis’, *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/274969>
- Alfonso-Loeches, S. *et al.* (2012) ‘Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse’, *Glia*, 60(6), pp. 948–964. <https://doi.org/10.1002/glia.22327>
- Al-Shahrour, F., Díaz-Uriarte, R. and Dopazo, J. (2004) ‘FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes’, *Bioinformatics*, 20(4), pp. 578–580. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg455>
- Al-Shahrour, F. *et al.* (2007) ‘FatiGO : a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments’, *Nucleic Acids Research*, pp. W91–W96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm260>
- aov function* - *RDocumentation* (no date). Available at: <https://www.rdocumentation.org/packages/stats/versions/3.6.2/topics/aov>
- Aragón, C. *et al.* (2002) ‘Alcohol y metabolismo humano’, *Adicciones*. <https://doi.org/10.20882/adicciones.541>
- Ashburner, M. *et al.* (2000) ‘Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium’, *Nature genetics*, 25(1), pp. 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Assi, E. *et al.* (2013) ‘Sphingolipids and brain resident macrophages in neuroinflammation: an emerging aspect of nervous system pathology’, *Clinical & developmental immunology*, 2013, p. 309302. <https://doi.org/10.1155/2013/309302>
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) ‘Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing’, *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, pp. 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Blanco, A. M. and Guerri, C. (2007) ‘Ethanol intake enhances inflammatory mediators in brain: role of glial cells and TLR4/IL-1RI receptors’, *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 12, pp. 2616–2630. <https://doi.org/10.2741/2259>
- Brites, D. and Fernandes, A. (2015) ‘Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation’, *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, p. 476. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00476>
- Broadhurst, D. I. and Kell, D. B. (2007) ‘Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments’, *Metabolomics*, pp. 171–196. <https://doi.org/10.1007/s11306-006-0037-z>

- Calder P. C. (2011) 'Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma' *European journal of pharmacology*, 668, pp. S50–S58. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.085>
- Català-Senent, J. F. *et al.* (2021) 'Hepatic steatosis and steatohepatitis: a functional meta-analysis of sex-based differences in transcriptomic studies', *Biology of sex differences*, 12(1), p. 29. <https://doi.org/10.1186/s13293-021-00368-1>
- Clair, G. *et al.* (2019) 'Lipid Mini-On: mining and ontology tool for enrichment analysis of lipidomic data', *Bioinformatics*, 35(21), pp. 4507–4508. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz250>
- Coliva, G. *et al.* (2020) 'Sphingomyelins Prevent Propagation of Lipid Peroxidation—LC-MS/MS Evaluation of Inhibition Mechanisms', *Molecules*, p. 1925. <https://doi.org/10.3390/molecules25081925>
- Colombaioni, L. and Garcia-Gil, M. (2004) 'Sphingolipid metabolites in neural signalling and function', *Brain research. Brain research reviews*, 46(3), pp. 328–355. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.07.014>
- Consortium, T. U. and The UniProt Consortium (2015) 'UniProt: a hub for protein information', *Nucleic Acids Research*, pp. D204–D212. <https://doi.org/10.1093/nar/gku989>
- Cuschieri, J. *et al.* (2007) 'Acid sphingomyelinase is required for lipid Raft TLR4 complex formation', *Surgical infections*, 8(1), pp. 91–106. <https://doi.org/10.1089/sur.2006.050>
- Cybernetics, B. (no date) *LIPEA*. Available at: <https://lipea.biotech.tu-dresden.de/about/how>
- Davies, L., Fassbender, K. and Walter, S. (2013) 'Sphingolipids in Neuroinflammation', *Sphingolipids in Disease*, pp. 421–430. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1511-4_21
- Donoso-Quezada, J., Ayala-Mar, S. and González-Valdez, J. (2021) 'The role of lipids in exosome biology and intercellular communication: Function, analytics and applications', *Traffic*, pp. 204–220. <https://doi.org/10.1111/tra.12803>
- EDADES (2019/2020) 'ENCUESTA SOBRE ALCOHOL Y OTRAS DROGAS EN ESPAÑA (EDADES), 1995-2019/2020'. Available at: https://pnsd.sanidad.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistemaInformacion/pdf/2019-20_Informe_EDADES.pdf
- ESPAD (2019) 'ESPAD Report 2019: Results from the European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs'. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Available at: <https://portal.findresearcher.sdu.dk/en/publications/espap-report-2019-results-from-the-european-school-survey-project>
- Everitt, B. (1992) 'Book reviews : Chambers JM, Hastie TJ eds 1992: Statistical models in S. California: Wadsworth and Brooks/Cole. ISBN 0 534 16765-9', *Statistical Methods in Medical Research*, pp. 220–221. <https://doi.org/10.1177/096228029200100208>
- Fahy, E. *et al.* (2005) 'A comprehensive classification system for lipids', *Journal of lipid research*, 46(5), pp. 839–861. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>

- Fahy, E. *et al.* (2011) ‘Lipid classification, structures and tools’, *Biochimica et biophysica acta*, 1811(11), pp. 637–647. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.009>
- Fahy, E. and Subramaniam, S. (2020) ‘RefMet: a reference nomenclature for metabolomics’, *Nature methods*, 17(12), pp. 1173–1174. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01009-y>
- Fernandez-Lizarbe, S., Pascual, M. and Guerri, C. (2009) ‘Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol’, *Journal of immunology*, 183(7), pp. 4733–4744. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803590>
- Flores-Bastías, O. and Karahanian, E. (2018) ‘Neuroinflammation produced by heavy alcohol intake is due to loops of interactions between Toll-like 4 and TNF receptors, peroxisome proliferator-activated receptors and the central melanocortin system: A novel hypothesis and new therapeutic avenues’, *Neuropharmacology*, 128, pp. 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.003>
- Fonseka P., *et al.* (2021) ‘FunRich enables enrichment analysis of OMICs datasets’ *Journal of molecular biology*, 433(11), p. 166747. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.166747>
- Frühbeis, C. *et al.* (2013) ‘Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication’, *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, p. 182. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00182>
- Frühbeis, C., Fröhlich, D. and Krämer-Albers, E.-M. (2012) ‘Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication’, *Frontiers in physiology*, 3, p. 119. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00119>
- García García, F. (2016) *Métodos de análisis de enriquecimiento funcional de estudios genómicos*. Edited by D. B. J. M. David. PhD. Universitat de València. Available at: https://books.google.com/books/about/M%C3%A9todos_de_an%C3%A1lisis_de_enriquecimiento.html?hl=&id=SXS4AQAACAAJ.
- Glen, S. (2021) ‘How to find outliers in easy steps. Hundreds of videos on elementary stats plus homework help forum. Statistics made simple. Always free!’, 29 January. Available at: <https://www.statisticshowto.com/statistics-basics/find-outliers/>.
- Goudriaan, A. E., Grekin, E. R. and Sher, K. J. (2007) ‘Decision Making and Binge Drinking: A Longitudinal Study’, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, pp. 928–938. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00378.x>
- Green, T., Flash, S. and Reiss, A. L. (2019) ‘Sex differences in psychiatric disorders: what we can learn from sex chromosome aneuploidies’, *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 44(1), pp. 9–21. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0153-2>
- Guerri, C. and Pascual, M. (2019) ‘Impact of neuroimmune activation induced by alcohol or drug abuse on adolescent brain development’, *International Journal of Developmental Neuroscience*, pp. 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.11.006>

- Hanson, K. L. *et al.* (2011) ‘Changes in neuropsychological functioning over 10 years following adolescent substance abuse treatment’, *Psychology of addictive behaviors: journal of the Society of Psychologists in Addictive Behaviors*, 25(1), pp. 127–142. <https://doi.org/10.1037/a0022350>
- Human Metabolome Database* (no date b). Available at: <https://hmdb.ca/>
- Ibáñez, F. *et al.* (2019) ‘TLR4 participates in the transmission of ethanol-induced neuroinflammation via astrocyte-derived extracellular vesicles’, *Journal of neuroinflammation*, 16(1), p. 136. <http://doi.org/10.1186/s12974-019-1529-x>
- Ibáñez, F. *et al.* (2020) ‘Circulating MicroRNAs in Extracellular Vesicles as Potential Biomarkers of Alcohol-Induced Neuroinflammation in Adolescence: Gender Differences’, *International journal of molecular sciences*, 21(18). <http://doi.org/10.3390/ijms21186730>
- Izumi, Y. *et al.* (2019) ‘Inter-Laboratory Comparison of Metabolite Measurements for Metabolomics Data Integration’, *Metabolites*, 9(11). <http://doi.org/10.3390/metabo9110257>
- Kanehisa, M. and Goto, S. (2000) ‘KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes’, *Nucleic acids research*, 28(1), pp. 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kim, A. M., Tingen, C. M. and Woodruff, T. K. (2010) ‘Sex bias in trials and treatment must end’, *Nature*, pp. 688–689. <https://doi.org/10.1038/465688a>
- Koelmel, J. P. *et al.* (2017) ‘Common cases of improper lipid annotation using high-resolution tandem mass spectrometry data and corresponding limitations in biological interpretation’, *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(8), pp. 766–770. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.02.016>
- Koskinen, S. M. *et al.* (2011) ‘A longitudinal twin study of effects of adolescent alcohol abuse on the neurophysiology of attention and orienting’, *Alcoholism, clinical and experimental research*, 35(7), pp. 1339–1350. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01470.x>
- Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S. (2014) ‘miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data’, *Nucleic acids research*, 42(Database issue), pp. D68–73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1181>
- Law, S.-H. *et al.* (2019) ‘An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases’, *International journal of molecular sciences*, 20(5). <https://doi.org/10.3390/ijms20051149>
- Lazar, I. *et al.* (2018) ‘A new role for extracellular vesicles: how small vesicles can feed tumors’ big appetite’, *Journal of lipid research*, 59(10), pp. 1793–1804. <https://doi.org/10.1194/jlr.R083725>
- Lee, J. Y. *et al.* (2001) ‘Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4’, *Journal of Biological Chemistry*, pp. 16683–16689. <https://doi.org/10.1074/jbc.m011695200>

- Lee, J. Y., Jin, H. K. and Bae, J.-S. (2020) ‘Sphingolipids in neuroinflammation: a potential target for diagnosis and therapy’, *BMB Reports*, pp. 28–34. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2020.53.1.278>
- Lee, S. K. (2018) ‘Sex as an important biological variable in biomedical research’, *BMB reports*, 51(4), pp. 167–173. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.4.034>
- lípid* (no date). Available at: <https://www.enciclopedia.cat/ec-gec-0119486.xml>
- LipidBank* (no date). Available at: <http://www.lipidbank.jp/index.html>
- LIPID MAPS* (no date). Available at: <https://www.lipidmaps.org/>
- LIPID MAPS® Lipidomics Gateway* (no date a) ‘*The LIPID MAPS® Lipidomics Gateway*’. Available at: <https://www.lipidmaps.org/>.
- Lipidomics Standards Initiative Consortium (2019) ‘Lipidomics needs more standardization’, *Nature metabolism*, 1(8), pp. 745–747. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0094-z>
- Lisa, S. (2020) *An R workflow for the statistical analysis of lipidomics data*. Edited by G. Christopher. Master of science in engineering der fachhochschule fh campus wien master-studiengang bioinformatik. Available at: <https://pub.fh-campuswien.ac.at/obvfcwhsacc/content/titleinfo/5449763/full.pdf>.
- Llorente, A. *et al.* (2013) ‘Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells’, *Biochimica et biophysica acta*, 1831(7), pp. <https://doi.org/1302-1309>. 10.1016/j.bbali.2013.04.011
- Lockshin, M. D. (2005) ‘Sex Differences in Autoimmune Disease’, *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases*, pp. 3–10. [https://doi.org/10.1016/s1571-5078\(05\)04002-x](https://doi.org/10.1016/s1571-5078(05)04002-x)
- López-Moreno, J. A. *et al.* (2015) ‘Histone Deacetylase Gene Expression Following Binge Alcohol Consumption in Rats and Humans’, *Alcoholism, clinical and experimental research*, 39(10), pp. 1939–1950. <https://doi.org/10.1111/acer.12850>
- Micheel, C. M. *et al.* (2012) *Evolution of Translational Omics: Lessons Learned and the Path Forward*. National Academies Press (US). <https://doi.org/10.17226/13297>
- M M i X (no date) *bioApS*, *Glossari bioApS*. Available at: <http://bioaps.uv.es/bioglossari/lipid/>.
- Mohamed, A. and Hill, M. M. (2021) ‘LipidSuite: interactive web server for lipidomics differential and enrichment analysis’, *Nucleic acids research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab327>
- Mohamed, A., Molendijk, J. and Hill, M. M. (2020) ‘lipidr: A Software Tool for Data Mining and Analysis of Lipidomics Datasets’, *Journal of proteome research*, 19(7), pp. 2890–2897. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00082>

- Molenaar, M. R. *et al.* (2019) 'LION/web: a web-based ontology enrichment tool for lipidomic data analysis', *GigaScience*, 8(6). <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz061>
- Montaner, D. and Dopazo, J. (2010) 'Multidimensional Gene Set Analysis of Genomic Data', *PLoS ONE*, p. e10348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010348>
- Montesinos, J. *et al.* (2015) 'TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment', *Brain, Behavior, and Immunity*, pp. 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.11.015>
- Montesinos, J. *et al.* (2016) 'Involvement of TLR4 in the long-term epigenetic changes, rewarding and anxiety effects induced by intermittent ethanol treatment in adolescence', *Brain, Behavior, and Immunity*, pp. 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.12.006>
- Monti, P. M. *et al.* (2005) 'Adolescence: Booze, Brains, and Behavior', *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, pp. 207–220. <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000153551.11000.f3>
- NIAAA (no date) *Binge Drinking*. Available at: <https://www.niaaa.nih.gov/publications/brochures-and-fact-sheets/binge-drinking>.
- Niemelä, P. S. *et al.* (2009) 'Bioinformatics and computational methods for lipidomics', *Journal of Chromatography B*, pp. 2855–2862. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.025>
- Pang, Z. *et al.* (2021) 'MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights', *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab382>
- Pascual-Lucas, M. *et al.* (2014) 'LPS or ethanol triggers clathrin- and rafts/caveolae-dependent endocytosis of TLR4 in cortical astrocytes', *Journal of Neurochemistry*, pp. 448–462. <https://doi.org/10.1111/jnc.12639>
- Pascual, M. *et al.* (2011) 'Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage', *Brain, behavior, and immunity*, 25 Suppl 1, pp. S80–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.02.012>
- Pascual, M. *et al.* (2015) 'Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2', *Neuropharmacology*, 89, pp. 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.014>
- Pascual, M. *et al.* (2017) 'Gender differences in the inflammatory cytokine and chemokine profiles induced by binge ethanol drinking in adolescence', *Addiction Biology*, pp. 1829–1841. <https://doi.org/10.1111/adb.12461>
- Pascual, M., Ibáñez, F. and Guerri, C. (2020) 'Exosomes as mediators of neuron-glia communication in neuroinflammation', *Neural Regeneration Research*, 15(5), pp. 796–801. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.268893>

- Pati, S. *et al.* (2016) 'Extraction, chromatographic and mass spectrometric methods for lipid analysis', *Biomedical chromatography: BMC*, 30(5), pp. 695–709. <https://doi.org/10.1002/bmc.3683>
- Pauling, J. and Klipp, E. (2016) 'Computational Lipidomics and Lipid Bioinformatics: Filling In the Blanks', *Journal of integrative bioinformatics*, 13(1), p. 299. <https://doi.org/10.2390/biecoll-jib-2016-299>
- Pérez-Díez, I. *et al.* (2021) 'Functional Signatures in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Sex-Based Differences in Transcriptomic Studies', *Cancers*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/cancers13010143>
- Perez-Gonzalez, R. *et al.* (2012) 'The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space', *The Journal of biological chemistry*, 287(51), pp. [https://doi.org/43108–43115](https://doi.org/43108-43115). 10.1074/jbc.M112.404467
- Phuyal, S. *et al.* (2015) 'The Ether Lipid Precursor Hexadecylglycerol Stimulates the Release and Changes the Composition of Exosomes Derived from PC-3 Cells', *The Journal of biological chemistry*, 290(7), p. 4225. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.593962>
- PubChem (no date) *PubChem*. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Ransohoff, D. F. (2005) 'Bias as a threat to the validity of cancer molecular-marker research', *Nature Reviews Cancer*, pp. 142–149. <https://doi.org/10.1038/nrc1550>
- Ritchie, M. E. *et al.* (2015) 'limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies', *Nucleic acids research*, 43(7), p. e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rubio-Araiz, A. *et al.* (2017) 'Disruption of blood-brain barrier integrity in postmortem alcoholic brain: preclinical evidence of TLR4 involvement from a binge-like drinking model', *Addiction biology*, 22(4), pp. 1103–1116. <https://doi.org/10.1111/adb.12376>
- Sanhueza, C., García-Moreno, L. M. and Expósito, J. (2011) 'Weekend alcoholism in youth and neurocognitive aging', *Psicothema*, 23(2), pp. 209–214.
- Serrano, M. I. (2002) 'Intoxicación alcohólica aguda', *Adicciones*. <https://doi.org/10.20882/adicciones.523>
- Skotland, T. *et al.* (2019) 'Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology', *Journal of lipid research*, 60(1), pp. 9–18. <https://doi.org/10.1194/jlr.R084343>
- Skotland, T. *et al.* (2020) 'An emerging focus on lipids in extracellular vesicles', *Advanced drug delivery reviews*, 159, pp. 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.03.002>
- Skotland, T., Sandvig, K. and Llorente, A. (2017) 'Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward', *Progress in lipid research*, 66, pp. 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.03.001>

- Squeglia, L. M., Jacobus, J. and Tapert, S. F. (2014) 'The effect of alcohol use on human adolescent brain structures and systems', *Handbook of Clinical Neurology*, pp. 501–510. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-62619-6.00028-8>
- Subra, C. *et al.* (2007) 'Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies', *Biochimie*, 89(2), pp. 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.10.014>
- Subramanian, A. *et al.* (2005) 'Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Sud, M. *et al.* (2007) 'LMSD: LIPID MAPS structure database', *Nucleic Acids Research*, pp. D527–D532. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl838>
- Su, H. *et al.* (2021) 'Characterization of brain-derived extracellular vesicle lipids in Alzheimer's disease', *Journal of extracellular vesicles*, 10(7). <https://doi.org/10.1002/jev2.12089>
- Tukey, J. W. (1962) 'Correction Notes: Correction to "The Future of Data Analysis"', *The Annals of Mathematical Statistics*, pp. 812–812. <https://doi.org/10.1214/aoms/1177704604>
- White, H. R. *et al.* (2011) 'Associations between heavy drinking and changes in impulsive behavior among adolescent boys', *Alcoholism, clinical and experimental research*, 35(2), pp. 295–303. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01345.x>
- WHO, *alcohol* (no date). Available at: <https://www.who.int/health-topics/alcohol>.
- World Health Organization (2019) *Global Status Report on Alcohol and Health 2018*. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565639>
- Yetukuri, L. *et al.* (2007) 'BMC Systems Biology', p. 12. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-1-12>
- Yetukuri, L. *et al.* (2008) 'Informatics and computational strategies for the study of lipids', *Molecular bioSystems*, 4(2), pp. 121–127. <https://doi.org/10.1039/b715468b>

