

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOINFORMÁTICA**



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

**METAANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS DE  
SEXO EN LOS EFECTOS DEL ALCOHOLISMO  
A NIVEL TRANSCRIPTÓMICO**

**AUTOR:**

**FRANC CASANOVA FERRER**

**TUTORES:**

**FRANCISCO GARCÍA GARCÍA**

**MARTA HIDALGO GARCÍA**

**MARÍA PASCUAL MORA**

**JULIO, 2019**





VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA



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

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOINFORMÁTICA**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

**METAANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS DE  
SEXO EN LOS EFECTOS DEL ALCOHOLISMO  
A NIVEL TRANSCRIPTÓMICO**

**AUTOR:**

**FRANC CASANOVA FERRER**

**TUTORES:**

**FRANCISCO GARCÍA GARCÍA**

**MARTA HIDALGO GARCÍA**

**MARÍA PASCUAL MORA**

---

**TRIBUNAL:**

PRESIDENTE/A:

VOCAL 1:

VOCAL 2:

**FECHA DE DEFENSA:**

**CALIFICACIÓN:**



## RESUMEN

El alcohol es la sustancia adictiva con el consumo más generalizado que existe. Debido a esto, el alcoholismo, o síndrome de dependencia del alcohol, es un problema en muchas comunidades y entre todas las edades; causando un severo deterioro tanto de la salud mental y física de la persona adicta como de sus relaciones sociales. En este aspecto, desde hace tiempo se sabe de la existencia de diferencias de sexo en los efectos del consumo de alcohol, tanto agudo como crónico, sobre el organismo. No obstante, solamente ahora, y gracias al desarrollo de las tecnologías ómicas, está siendo posible observar los mecanismos responsables de dichas diferencias; cuyo conocimiento podría abrir las puertas a nuevas formas de combatir el alcoholismo, además del desarrollo de terapias personalizadas durante la fase de rehabilitación de los pacientes.

Con este objetivo, se ha llevado a cabo un metaanálisis combinando los datos de diversos estudios transcriptómicos, cuyos resultados apuntan a la actuación de mecanismos distintos en cada sexo, però en todo momento centrados mayormente en la degeneración hepática y neuronal.

**Palabras clave:** síndrome de dependencia del alcohol, sexo, metaanálisis, transcriptómica.

## ABSTRACT

Alcohol is the addictive substance with the most widespread consumption that exists. Because of this, alcoholism, also known as alcohol dependence syndrome, is a problem in many communities and across all ages; causing serious detriment to the mental and physical health of the addict, as well as to their social relationships. Related to this aspect is the known fact of sex differences in the effects of alcohol consumption, both acute and chronic, on the organism. However, only currently, and thanks to the development of omic sciences, is it possible to observe the mechanisms responsible for such differences; whose knowledge could open the path to new ways of fighting alcoholism and the development of personalized therapies better fitted for the rehabilitation of patients.

With this aim a meta-analysis has been carried, in which the data of several transcriptomic studies has been combine, and whose results point to different mechanisms acting in each sex, but in both cases focused mainly around neuronal and hepatic degeneration.

**Keywords:** alcohol dependence syndrome, sex, meta-analysis, transcriptomics.



# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. El consumo de alcohol	1
1.1.1. El alcohol y su contexto histórico	2
1.1.2. El alcohol como droga	3
1.1.3. Metabolismo del alcohol	3
1.1.4. Mecanismos de acción del alcohol en el cerebro	4
1.1.5. Factores de riesgo	5
1.1.6. Diagnóstico y tratamiento	6
1.2. Datos ómicos y tecnologías de alto rendimiento	7
1.2.1. Transcriptómica y tecnologías de análisis	9
1.2.2. Caracterización funcional	10
1.2.3. Metaanálisis	11
<b>2. Objetivos</b>	<b>12</b>
<b>3. Material y métodos</b>	<b>13</b>
3.1. Revisión sistemática y selección de estudios	13
3.2. Análisis individual de los estudios	14
3.2.1. Procesamiento de los datos	14
3.2.2. Análisis exploratorio	15
3.2.3. Análisis de expresión diferencial	16
3.2.4. Análisis de enriquecimiento funcional	16
3.2.5. Análisis de las rutas de señalización	17
3.3. Metaanálisis	17
3.3.1. Determinación de la medida combinada del efecto	17
3.3.2. Evaluación de la heterogeneidad	19
3.3.3. Representación de los resultados	20
<b>4. Resultados</b>	<b>21</b>
4.1. Revisión sistemática	21
4.2. Análisis individual de los estudios	23
4.2.1. Análisis exploratorio	23
4.2.2. Análisis de expresión diferencial	30
4.2.3. Análisis de enriquecimiento funcional	32
4.2.4. Análisis de rutas de señalización	38
4.3. Metaanálisis	38
4.3.1. Procesos biológicos	39
4.3.2. Componentes celulares	39
4.3.3. Funciones moleculares	39
<b>5. Discusión</b>	<b>40</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>47</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>48</b>
<b>Anexo A – Figuras</b>	<b>55</b>
<b>Anexo B – Tablas</b>	<b>63</b>

## Índice de figuras

1.1	Consumo medio de alcohol por países.....	1
1.2	Fermentación alcohólica.....	2
1.3	Metabolismo del alcohol.....	4
1.4	Dogma central de la biología molecular.....	8
3.1	Diagrama de flujo de revisión sistemática.....	14
3.2	Ejemplo de gráfico de embudo.....	19
3.3	Ejemplo de gráfico de bosque.....	20
4.1	Diagrama de flujo seguido en esta revisión sistemática.....	22
4.2	Diagrama de cajas del estudio GSE44456.....	23
4.3	Diagrama de cajas del estudio GSE49376.....	23
4.4	Diagrama de cajas del estudio GSE52553.....	24
4.5	Diagrama de cajas del estudio GSE59206.....	24
4.6	Número de sujetos por sexo, condición y estudio.....	25
4.7	Gráfico de Componentes principales del estudio GSE44456.....	26
4.8	Gráfico de Componentes principales del estudio GSE49376.....	27
4.9	Gráfico de Componentes principales del estudio GSE52553.....	28
4.10	Gráfico de Componentes principales del estudio GSE59206.....	29
4.11	Diagrama UpSet con los términos de procesos biológicos UP.....	34
4.12	Diagrama UpSet con los términos de componentes celulares UP.....	34
4.13	Diagrama UpSet con los términos de funciones moleculares UP.....	35
4.14	Diagrama UpSet con las rutas KEGG UP.....	35
4.15	Diagrama UpSet con los términos de procesos biológicos DOWN.....	36
4.16	Diagrama UpSet con los términos de componentes celulares DOWN.....	36
4.17	Diagrama UpSet con los términos de funciones moleculares DOWN.....	37
4.18	Diagrama UpSet con las rutas KEGG DOWN.....	37
4.19	Número de funciones significativas por ontología y sexo.....	38
A.1	Gráfico de embudo para el término GO:0002030.....	55
A.2	Gráfico de embudo para el término GO:0035724.....	55
A.3	Gráfico de embudo para el término GO:0061763.....	55
A.4	Gráfico de embudo para el término GO:1901492.....	55
A.5	Gráfico de embudo para el término GO:2000474.....	56
A.6	Gráfico de embudo para el término GO:2000565.....	56
A.7	Gráfico de embudo para el término GO:0098675.....	56
A.8	Gráfico de embudo para el término GO:0003882.....	56
A.9	Gráfico de embudo para el término GO:0004380.....	57
A.10	Gráfico de embudo para el término GO:0016418.....	57
A.11	Gráfico de embudo para el término GO:0031997.....	57
A.12	Gráfico de embudo para el término GO:0047635.....	57
A.13	Gráfico de embudo para el término GO:0102131.....	58
A.14	Gráfico de bosque para el término GO:0002030.....	58
A.15	Gráfico de bosque para el término GO:0035724.....	58
A.16	Gráfico de bosque para el término GO:0061763.....	59
A.17	Gráfico de bosque para el término GO:1901492.....	59
A.18	Gráfico de bosque para el término GO:2000474.....	59
A.19	Gráfico de bosque para el término GO:2000565.....	60
A.20	Gráfico de bosque para el término GO:0098675.....	60
A.21	Gráfico de bosque para el término GO:0003882.....	60

A.22	Gráfico de bosque para el término GO:0004380.....	61
A.23	Gráfico de bosque para el término GO:0016418.....	61
A.24	Gráfico de bosque para el término GO:0031997.....	61
A.25	Gráfico de bosque para el término GO:0047635.....	62
A.26	Gráfico de bosque para el término GO:0102131.....	62

## Índice de tablas

4.1	Estudios seleccionados.....	21
4.2	Agrupación de muestras del estudio GSE44456.....	26
4.3	Agrupación de muestras del estudio GSE49376.....	27
4.4	Agrupación de muestras del estudio GSE52553.....	28
4.5	Agrupación de muestras del estudio GSE59206.....	30
4.6	Genes diferencialmente expresados en cada estudio.....	31
4.7	Enriquecimiento funcional del estudio GSE44456.....	32
4.8	Enriquecimiento funcional del estudio GSE49376.....	32
4.9	Enriquecimiento funcional del estudio GSE52553.....	33
4.10	Enriquecimiento funcional del estudio GSE59206.....	33
B.1	Paquetes de R usados y sus versiones.....	63
B.2	Términos GO BP significativos tras el metaanálisis.....	64
B.3	Términos GO CC significativos tras el metaanálisis.....	65
B.4	Términos GO MF significativos tras el metaanálisis.....	66

## Glosario de acrónimos

<b>ACP</b>	Proteína portadora de acilo
<b>ADH</b>	Alcohol deshidrogenasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ALDH</b>	Aldehído deshidrogenasa
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BH</b>	Modelo de ajuste de p-valor de Benjamini y Hochberg
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>BP</b>	Procesos biológicos
<b>CC</b>	Componentes celulares
<b>CCAA</b>	<i>Canonical Circuit Activity Analysis</i>
<b>CYP2E1</b>	Citocromo P450
<b>DL</b>	Modelo de metaanálisis de DerSimonian y Laird
<b>DSM-5</b>	5ª edición de <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
<b>EB</b>	Modelo de metaanálisis de empirical Bayes
<b>FAIR</b>	Findable, Accessible, Interoperable, Reusable
<b>FE</b>	Modelo de metaanálisis de efectos fijos
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GEO</b>	Gene Expression Omnibus
<b>GO</b>	Gene Ontology
<b>GSEA</b>	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
<b>HE</b>	Modelo de metaanálisis de Hedges
<b>HS</b>	Modelo de metaanálisis de Hunter y Schmidt
<b>KEGG</b>	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
<b>logFC</b>	Logaritmo de la magnitud de cambio

<b>LOR</b>	Logaritmos de los odds ratio
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales
<b>RNAseq</b>	Secuenciación de ARN
<b>SDA</b>	Síndrome de dependencia del alcohol
<b>SJ</b>	Modelo de metaanálisis de Sidik-Jonkman
<b>TLR4</b>	<i>Toll-like receptor 4</i>

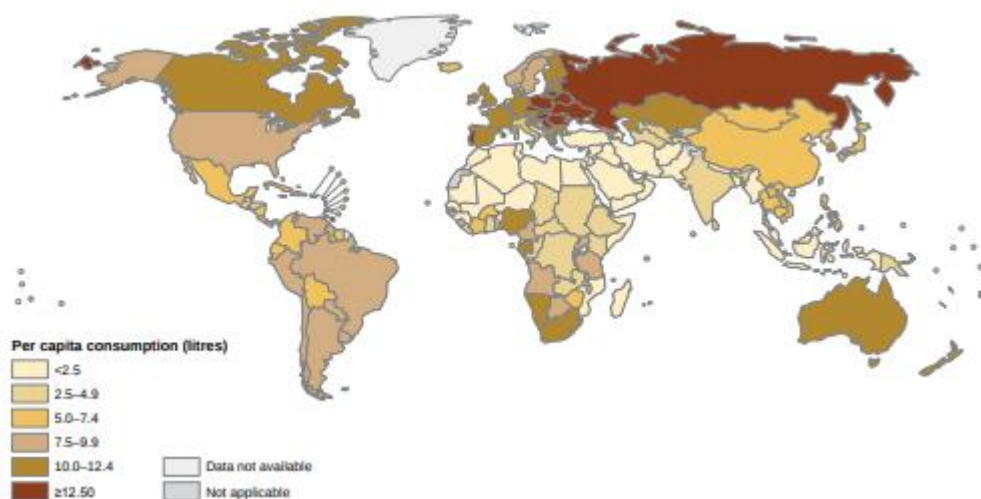


# 1. Introducción

El alcoholismo es una de las adicciones con mayor prevalencia en el mundo según la Organización Mundial de la Salud (OMS), pues afecta a más del 4% de la población mundial por encima de 15 años [1]. A pesar de que el término más comúnmente usado es alcoholismo, el término técnico usado para esta adicción es Síndrome de Dependencia del Alcohol (SDA). En la actualidad se conocen ciertas diferencias entre sexos en los efectos del consumo de alcohol, tanto agudo como crónico [2]. Dada la considerable prevalencia de esta adicción en todo el mundo, en este trabajo se pretende analizar mediante una técnica de metaanálisis cuáles son los mecanismos biológicos detrás de dichas diferencias.

## 1.1. El consumo de alcohol

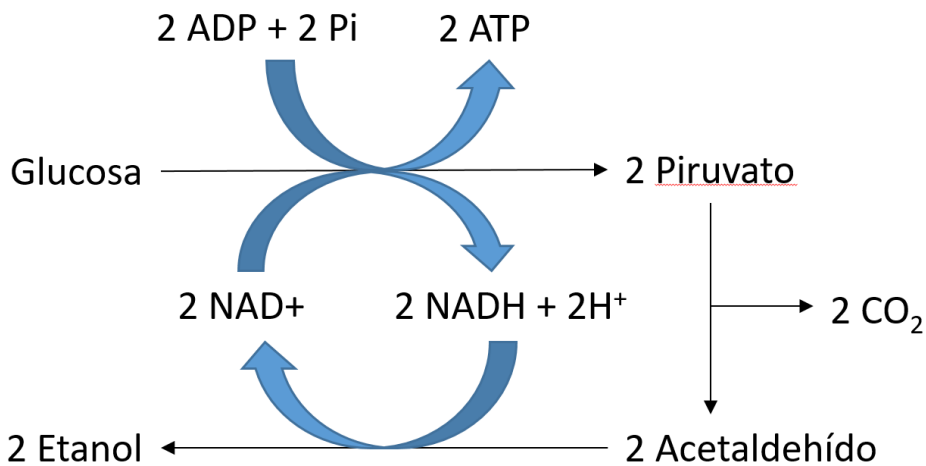
Además de su considerable prevalencia, el consumo descontrolado de alcohol se ha llegado a relacionar con más de 200 problemas de salud distintos, lo cual evidencia la gran cantidad de formas en que esta sustancia puede llegar a perjudicar al organismo [3], tanto a nivel físico como mental. Adicionalmente, se observa que el alcohol es la causa de aproximadamente el 6% de las muertes en todo el mundo cada año [1], además de representar un elevado coste para el sistema de salud en el tratamiento de las dolencias relacionadas con esta patología. Sin embargo, existe una gran variación en estas cifras entre los distintos países, siendo los lugares con mayor incidencia aquellos con una cultura predominantemente occidental o eslava [1] (figura 1.1).



**Figura 1.1:** Consumo total de alcohol per cápita por países en el 2010 [1].

### 1.1.1. El alcohol y su contexto histórico

Cuando se habla de alcohol fuera de un ámbito científico normalmente es en referencia al alcohol etílico, o etanol ( $C_2H_5OH$ ) [4]. El alcohol es el resultado de la fermentación etílica llevada a cabo por algunas levaduras (figura 1.2), y con su efecto bactericida ayuda a estas a evitar la competencia por parte de las bacterias [5]. Generalmente esta sustancia se acumula en muchas frutas maduras, ricas en azúcares que las levaduras pueden fermentar, y sirve a los animales que las consumen para detectar potenciales fuentes de nutrientes que podrían desaparecer pronto [5]. Así, la utilidad que supone la detección de etanol en los frutos maduros sería la razón evolutiva detrás de la capacidad de los humanos para metabolizar ciertas cantidades de esta sustancia antes de sufrir una intoxicación severa [5]. De hecho, siguiendo el consumo de alcohol desde nuestros ancestros frugívoros, se llega a un punto en que alcohol empieza a estar estrechamente ligado al desarrollo histórico y cultural de la humanidad, datando los primeros registros de elaboración de bebidas alcohólicas de alrededor del año 7000 a.C. [6, 7]. En la actualidad, la principal razón que ha contribuido a que el alcohol sea la sustancia recreativa cuyo consumo está más extendido, es la aceptación social que ha tenido históricamente [1, 6]; siendo frecuente el consumo moderado de bebidas alcohólicas entre la población adulta de cualquier país. La principal excepción serían los países musulmanes, donde el consumo de esta sustancia está prohibido por razones religiosas [1].



**Figura 1.2:** Fermentación etílica de la glucosa.

### **1.1.2. El alcohol como droga**

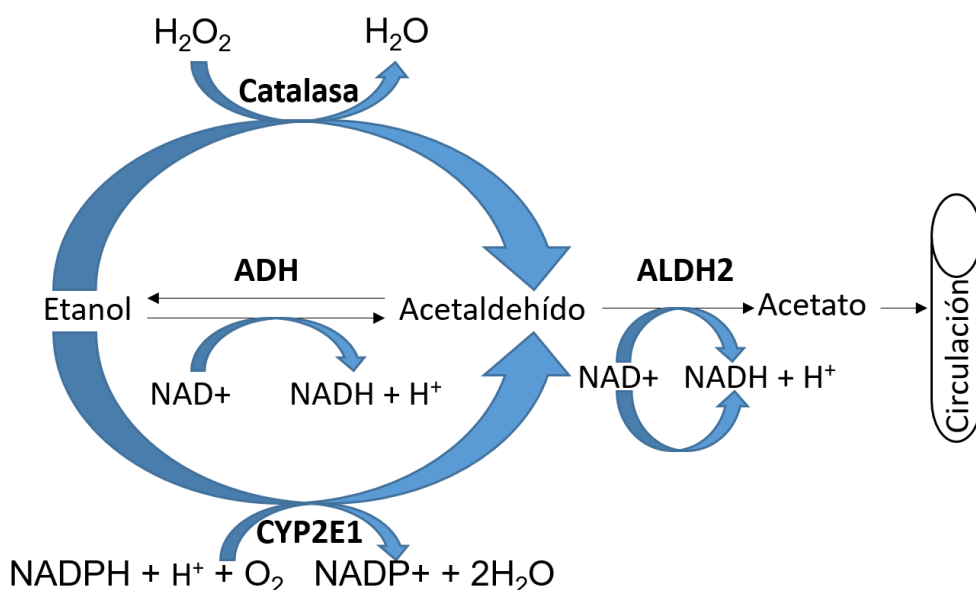
La gran popularidad de la que disfrutaban las bebidas alcohólicas como sustancia recreativa se debe a los efectos psicoactivos del etanol, que permiten que quien lo consuma alcance un estado de consciencia alterada que le resulte placentero. Los efectos del consumo de alcohol incluyen, pero no están limitados a: euforia, desinhibición, visión borrosa, falta de coordinación, problemas de memoria y deshidratación [8]. Además de los efectos psicoactivos que presenta, el organismo es capaz de desarrollar tolerancia y dependencia física hacia el alcohol debido a su interacción con el sistema de recompensa cerebral, haciendo que el consumidor requiera una cantidad cada vez mayor del mismo para alcanzar el estado de consciencia alterada deseado. Estos efectos pueden llegar a un punto en el que el consumo de alcohol sea necesario para mantener una vida funcional en el día a día [8]. Así, dadas estas características, es correcto considerar al alcohol como una droga; siendo la adicción a esta droga el SDA.

### **1.1.3. Metabolismo del alcohol**

Una vez que el etanol es ingerido, éste es directamente absorbido a través de las paredes del intestino delgado, y pasa al torrente sanguíneo, que distribuye la sustancia por todo el organismo. Debido a sus características físico-químicas el etanol es capaz de atravesar tanto la barrera hematoencefálica (BHE) como la placentaria, siendo los niveles de alcohol en sangre similares a los de cerebro [9]. El metabolismo del alcohol tiene lugar principalmente a nivel hepático mediante tres sistemas enzimáticos: la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) citosólica, el Citocromo P450 (CYP2E1) microsomal y la catalasa, que se encuentra principalmente en los peroxisomas [10, 11] (figura 1.3). Exceptuando la enzima ADH, los otros dos sistemas de metabolización del etanol también pueden encontrarse en el cerebro, indicando una cierta capacidad por parte del mismo para disminuir sus niveles de alcohol [12]. Tanto el Citocromo P450 como la Catalasa se ven involucrados en la producción de  $H_2O_2$ , una sustancia con una alta capacidad para causar estrés oxidativo en el organismo.

Estos tres sistemas enzimáticos generan acetaldehído como producto metabólico, que es un compuesto considerablemente más tóxico que el etanol debido a su capacidad para unirse a los grupos SH de las proteínas; dando lugar a subproductos metabólicos que activan, a su vez, el sistema inmunitario [13]. No obstante, el acetaldehído es, a su vez, metabolizado en las mitocondrias por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) que produce acetato y NADH (figura 1.3). Finalmente, el acetato es metabolizado en otros tejidos para dar lugar a acetil Co-A, que normalmente se convertirá en dióxido de carbono y agua, aunque según las necesidades del organismo una pequeña proporción puede ser usada para la síntesis de ácidos grasos [14, 15].

Debido a su función en el metabolismo del alcohol, el hígado es uno de los principales órganos que se ven dañados en personas que padecen SDA, dando lugar a enfermedades como la hepatopatía alcohólica o la cirrosis [16]. Los principales mecanismos implicados en el desarrollo de dichas dolencias son: la toxicidad del acetaldehído, la generación de radicales libres por la acción de CYP2E1, y el desequilibrio en la relación NAD/NADH. Debido a la capacidad del cerebro para metabolizar alcohol, estos mecanismos también podrían tener como consecuencia la degeneración que se observa en el cerebro [17]. Trabajos recientes también han relacionado los efectos del etanol con el sistema inmunitario debido a la liberación a nivel intestinal de lipopolisacáridos (LPS); una endotoxina generada por algunas bacterias capaz de activar los macrófagos hepáticos (células de Kupffer) y generar inflamación hepática, que favorecería el desarrollo de la hepatopatía alcohólica [18].



**Figura 1.3:** Esquema del metabolismo del etanol.

#### 1.1.4. Mecanismos de acción del alcohol en el cerebro

Además de los daños que el alcohol puede causar sobre el hígado durante su metabolismo, otro de los órganos que sufre más daños y de forma más directa por parte de esta sustancia es el cerebro. Los efectos del alcohol sobre el cerebro son muchos y muy diversos; pudiendo llegar a ser particularmente severos en áreas como la corteza prefrontal, el hipocampo, o el cerebelo. Estos efectos pueden llegar hasta el punto de producir cambios moleculares, celulares y neuroquímicos, que conllevan a alteraciones irreversibles de la estructura del cerebro.

Entre los efectos del alcohol destaca su acción específica sobre las proteínas receptoras de los canales presentes en la membrana celular; aunque también es capaz de causar alteraciones de forma inespecífica sobre la fluidez de dicha membrana. Por otro lado, también es remarcable su capacidad de alterar múltiples

sistemas de neurotransmisores, entre los que se incluyen: ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), dopamina, glutamato y opioides. Aunque todas estas sustancias intervienen en numerosos circuitos neuronales y su alteración puede tener efectos drásticos sobre la función cerebral, de especial importancia es GABA; pues se trata del principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central [19], y participa junto con los opioides en el sistema de recompensa [20]. Una de las formas en que el SDA es capaz de alterar más severamente la estructura cerebral se da sobre los receptores de GABA, pues estos se ven reducidos en cantidad en personas adictas, lo cual se relacionaría con el desarrollo de tolerancia hacia la sustancia [19].

Otro factor a considerar entre los efectos del alcohol en el cerebro es la activación del sistema inmunitario innato. Se trata de una respuesta neuroinflamatoria mediada por el *Toll-like receptor 4* (TLR4). La activación de este receptor conlleva la liberación de mediadores y moléculas pro-inflamatorias que pueden producir alteraciones en la mielina de las neuronas, promoviendo así un mayor daño neuronal que puede causar una progresiva neurodegeneración y, con el tiempo, derivar en cambios del comportamiento, alteraciones de la memoria y desarrollo de ansiedad [21].

#### **1.1.5. Factores de riesgo**

El SDA es una enfermedad multifactorial, con un peso conjunto de aproximadamente el 50% para los factores de origen genético y otro 50% para los factores de origen ambiental [22].

Entre los factores ambientales con una influencia destacable se encontraría la presión social, un bajo nivel socioeconómico o las situaciones de abuso y alto estrés durante la infancia [23]. También entrarían en esta categoría algunos de los efectos del propio consumo de alcohol, pues durante la adolescencia este favorece la aparición de SDA en un futuro al impedir el correcto desarrollo de ciertas estructuras cerebrales [24, 25].

A nivel genético existirían un gran número de genes que, individualmente, presentan una modesta influencia. Entre estos genes destacarían aquellos implicados en la síntesis y funcionamiento de los receptores de serotonina, GABA, dopamina y glutamato; además de algunos relacionados con la formación de canales de cloro y potasio [10, 26]. Sin embargo, el factor genético más estudiado, y quizás el más influyente ante el desarrollo de SDA, es el que está directamente relacionado con el metabolismo del alcohol en el hígado; pues se ha observado que las personas con variantes hiperactivas de la enzima ADH tienden a desarrollar SDA en menor medida que otros individuos. La hiperactividad de esta enzima propicia la rápida acumulación de acetaldehído en el cuerpo, causando la rápida aparición de los síntomas más desagradables relacionados con el consumo de alcohol y desalentando el consumo de cantidades mayores del mismo; con lo que

se dificulta el desarrollo de conductas dependientes relacionadas con la sustancia [27].

También se ha observado un efecto de los factores epigenéticos, que también contribuyen en el desarrollo de tolerancia y en la adicción, tanto con el alcohol como con otras drogas [21].

Otro factor que ha demostrado ser significativo en la susceptibilidad a sufrir SDA es el sexo [2], que por un lado conlleva una fuerte carga ambiental a causa de la distinta presión que sufre cada sexo por parte de la sociedad de cara al consumo de alcohol. Sin embargo, se han observado también importantes diferencias dependientes únicamente del sexo como factor biológico. Una de dichas diferencias sería la mayor susceptibilidad por parte de las mujeres a sufrir los efectos perniciosos del alcohol ante una dosis igual que la de un hombre. Esta mayor susceptibilidad se debería a factores que, de media, son distintos en mujeres respecto de hombres, como el menor peso de las mujeres, su mayor proporción de grasa corporal, su menor capacidad para metabolizar el alcohol, y el riesgo que el consumo del mismo supone para el desarrollo de cáncer de mama [28]. En este sentido también se ha observado el efecto del desarrollo hormonal sobre la susceptibilidad al alcohol y el SDA, pues en sujetos que todavía no han pasado la pubertad dichas diferencias entre hombres y mujeres son mucho menores que en sujetos adultos [2]. Es además destacable que, aunque la carga hereditaria es similar en ambos sexos (aproximadamente 50%), los genes responsables de dicha carga solo se solapan parcialmente entre sexos, cosa que indicaría que algunos de los genes que parecen influir en el desarrollo de SDA en hombres no están implicados en dicha susceptibilidad en mujeres, y viceversa [29].

### **1.1.6. Diagnóstico y tratamiento**

Diversas organizaciones, a lo largo de los años, han desarrollado métodos para diagnosticar el SDA; siendo el sistema de diagnóstico más actualizado y ampliamente utilizado el que está recogido en la quinta versión de *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-5) de la Asociación Americana de Psiquiatría, y que comprende tres niveles de SDA: leve, moderado y severo [4]. El método de diagnóstico que propone el DSM-5 es un cuestionario, y según la cantidad de preguntas a las que responda el paciente afirmativamente es posible determinar cómo de severo es su SDA, o si su patrón de consumo de alcohol no es peligroso. Si el paciente contesta afirmativamente a 2 o 3 preguntas del cuestionario del DSM-5 se diría que sufre un caso de SDA ligero, mientras que, si son 4 o 5 sería un caso moderado, y 6 o más un caso severo [4].

Para tratar el SDA el primer paso es la desintoxicación de la persona adicta. Esto implica el cese abrupto del consumo de alcohol, que puede estar acompañado por la administración de alguna droga sustitutiva para evitar los síntomas del

síndrome de abstinencia, también conocido como *delirium tremens*, y que puede llegar a ser mortal [30]. No obstante, estas sustancias sustitutivas deben ser administradas con suma precaución, pues pueden causar que el paciente desarrolle una nueva adicción. Este procedimiento se lleva a cabo hasta que el paciente haya superado las fases iniciales del síndrome de abstinencia, que son las más críticas, pero existen algunos síntomas que pueden llegar a tardar años en desaparecer debido a la capacidad del alcohol para alterar la estructura cerebral [31, 32].

Tras la desintoxicación normalmente la persona adicta pasa a someterse a algún tratamiento de carácter psicológico para evitar recaídas. Entre las terapias más comunes se encuentra la terapia de grupo, donde destacan asociaciones como Alcohólicos Anónimos y su programa de doce pasos. Finalmente, si la rehabilitación es exitosa, el paciente seguirá una vida de total abstinencia. Aunque se han documentado casos de personas rehabilitadas que toman alcohol con moderación, esta práctica muchas veces termina con una recaída o una total abstinencia tarde o temprano [33].

Por otro lado, también existe una serie de fármacos que pueden ayudar en el tratamiento del SDA, y que pueden ser administrados como complemento a la terapia de rehabilitación ya mencionada. Entre estos fármacos destacan el Disulfiram, la Naltrexona y el Acamprosato [10, 11].

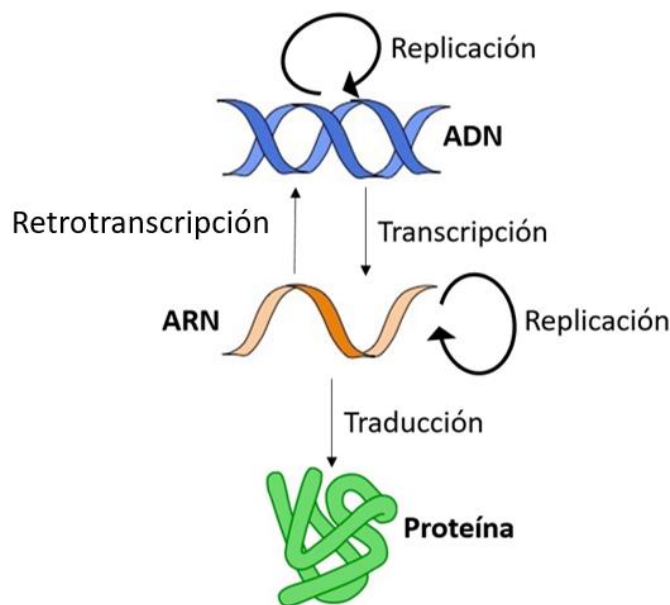
En el caso del Disulfiram su efecto se da directamente sobre la metabolización del alcohol en el hígado. Esta sustancia interrumpe el proceso y causa la acumulación de acetaldehído en el cuerpo, con los efectos perniciosos anteriormente descritos, y dificultando así una posible recaída [27]. Por otro lado, la Naltrexona y el Acamprosato si actúan directamente sobre el cerebro, bloqueando los receptores de opiáceos en el primer caso y la acción del glutamato en el segundo [10, 11, 31]. Gracias a su acción, estas dos sustancias son capaces de reducir la sensación de ansiedad que acompaña las primeras fases de la desintoxicación, y que muchas veces es un factor de gran importancia en las recaídas.

## **1.2. Datos ómicos y tecnologías de alto rendimiento**

La información necesaria para el desarrollo y funcionamiento de todo organismo se encuentra codificada, en su totalidad, en su genoma. En prácticamente todos los casos dicho genoma está compuesto por ácido desoxirribonucleico (ADN), un polímero de nucleótidos que se encuentran dispuestos formando dos cadenas antiparalelas [34]. En humanos este genoma está compuesto, si no hay errores, por 23 parejas de estas cadenas, que se encuentran en el núcleo celular, y una molécula circular en cada mitocondria. Los nucleótidos que componen dicha molécula son la adenina, citosina, guanina y timina [35].

Para llevar a cabo las funciones codificadas en el genoma, primero es necesario pasar por el proceso de transcripción, en el cual se generan moléculas de ácido ribonucleico (ARN) usando una sección del genoma como molde. Esta nueva molécula sigue siendo un polímero de nucleótidos, con la excepción de que está compuesto por una sola cadena, en lugar de timina tiene uracilo, y la pentosa que forma parte de su estructura es la ribosa, no la desoxirribosa [35]. Existen muchos tipos de ARN, cada uno con una función distinta, pero en el proceso de expresión genética el más importante es el ARN mensajero (ARNm), que una vez transcrito sale del núcleo celular para dirigirse hacia los ribosomas, donde pasa por el proceso de traducción. Durante este paso se forma una cadena de aminoácidos siguiendo la información contenida en la molécula de ARNm, que dará lugar a una proteína, que será la encargada de llevar a cabo la función que le corresponda [35].

Estas dos funciones, junto con la replicación y la transcripción reversa, dan lugar al que es conocido como el dogma central de la biología molecular [36] (figura 1.4), que resume los mecanismos mediante los cuales las instrucciones contenidas en el genoma dan lugar a las proteínas encargadas de llevar a cabo las funciones necesarias para la supervivencia del organismo. Desde la formulación de este principio, y durante las últimas décadas, la atención dedicada al campo de la biología molecular, y en particular al de la expresión genética, ha ido progresivamente en aumento.



**Figura 1.4:** Representación del dogma central de la biología molecular.

Dentro de este campo se hallarían las ciencias ómicas, que se centran en el estudio de cada uno de los pasos descritos por este dogma en su conjunto. Así, la primera referencia a este campo se dio en 1986, con la descripción de la genómica como el estudio del conjunto completo de genes de un organismo [37]. Con el paso de los años y el desarrollo de nuevas herramientas de trabajo ha sido posible avanzar en las ciencias ómicas y desarrollar estas más allá de la genómica, dando lugar así a la transcriptómica y proteómica [37, 38]. Tanto es así que actualmente han llegado a desarrollarse ciencias ómicas cuyo enfoque trasciende los conceptos originales del dogma central de la biología molecular, con casos como la

metabolómica y la interactómica [38]. No obstante, si hay algo que todos estos novedosos campos de la investigación tienen en común es su abordaje holístico y el hecho de requerir una considerable capacidad de procesamiento debido a la gran cantidad de datos que generan en sus estudios.

### **1.2.1. Transcriptómica y tecnologías de análisis**

Entre las distintas ciencias ómicas, una de las que ha visto un mayor progreso durante las últimas décadas es la transcriptómica. Mientras que el campo de la genómica estudia principalmente la secuencia del genoma de los seres vivos, la transcriptómica se centra en los niveles a los que se expresan dichas secuencias [38]. En este caso se analiza el transcriptoma, que es el conjunto de secuencias de ARN transcritas a partir del genoma; sin ser estas secuencias, necesariamente, de ARNm. Así, la información que proporciona la transcriptómica es crucial para conocer una gran cantidad de detalles acerca del metabolismo celular, y cómo este se ve alterado en distintas situaciones, como en enfermedades o ante distintos estímulos [38].

El desarrollo de la transcriptómica ha sido solo posible gracias a la creación de plataformas como los chips de ADN [39]. El funcionamiento de esta tecnología se basa en la adhesión de sondas de ADN a un soporte sólido en una determinada disposición. Posteriormente se deposita el transcriptoma de una muestra de interés sobre dicho soporte. Esta técnica incluye una forma de reconocimiento, normalmente mediante el acoplamiento de una molécula fluorescente o radiactiva a la muestra, de forma que es posible identificar la cantidad en que se ha transcrito una determinada parte del genoma según la intensidad de la señal observada en la sonda correspondiente a dicha secuencia. De esta forma es posible identificar los niveles de transcripción de miles de secuencias a la vez, y con el uso de distintas moléculas de marcaje para muestras distintas es posible incluso identificar dichos niveles en más de una muestra a la vez, además observar cómo se ven alterados en cada una de las situaciones [40, 41].

También se han desarrollado técnicas como la de RNAseq [42]. La aparición de esta técnica fue posterior a la de los chips de ADN, y fue posible solamente gracias al descubrimiento y adaptación de la enzima retrotranscriptasa, presente en los retrovirus. En este caso se recurre a las técnicas de secuenciación masiva para, en primer lugar, transcribir el ARN a ADN, y posteriormente secuenciar las secuencias resultantes. Esta metodología incluye importantes mejoras respecto de los chips, como la identificación de secuencias que podrían no estar presentes en las sondas de un chip de ADN, o la mejor diferenciación de isoformas y secuencias cortas, que podrían hibridar incorrectamente en un estudio con chips de ADN [43].

Los resultados ofrecidos por estas plataformas se muestran como tablas de datos donde se indica, en el caso de los chips de ADN, la intensidad lumínica de cada una de las sondas, y en el de RNAseq el número de transcritos de una secuencia específica. Dicha información es posteriormente procesada según convenga para el estudio que se esté llevando a cabo [43, 44]. Las estrategias que se siguen son, principalmente, tres:

- Análisis de expresión diferencial: sirve para identificar qué transcritos varían significativamente sus niveles de expresión entre las distintas condiciones estudiadas
- Predicción de clases: teniendo en cuenta un grupo de datos de ejemplo, con perfiles transcriptómicos ya separados en distintas condiciones, es posible adjudicar nuevos perfiles transcriptómicos a alguna de estas condiciones ya establecidas
- Análisis cluster o clasificación no supervisada: permite la detección de grupos de genes o muestras con perfiles transcriptómicos similares.

### 1.2.2. Caracterización funcional

El análisis de expresión diferencial es uno de los acercamientos más usados en estos casos, y puede ofrecer gran cantidad de resultados a nivel estadístico; pero una de sus principales limitaciones radica en el hecho de que este se realiza sobre cada una de las secuencias de forma independiente, sin mayor consideración acerca de las implicaciones que tiene cada transcrito sobre el funcionamiento del organismo. Ante esta situación es recomendable incluir algún tipo de información biológica acerca de los genes considerados, facilitando así la interpretación de los resultados obtenidos [44]. Especialmente útiles son las bases de datos que incluyen algún tipo de información funcional referente a los genes, siendo las más utilizadas:

- *Gene Ontology* (GO), donde se encuentra información acerca de los procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares con los que está relacionado cada gen, clasificados jerárquicamente en tres ontologías distintas [45, 46].
- *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), donde se encuentra información sobre los genes y las rutas metabólicas en las que estos intervienen [47, 48, 49].

Una vez añadida esta información a los genes considerados en el estudio es posible llevar a cabo un *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), o análisis de enriquecimiento funcional [44, 50]. Esta metodología clasifica los genes considerados según sus niveles de expresión para determinar si hay alguna función que, de forma generalizada, se esté viendo sobreexpresada o inhibida en alguna de las condiciones estudiadas; incorporando así una nueva capa de significado biológico a los resultados obtenidos. Este método, además, permite obtener resultados significativos a partir de conjuntos de datos en los que aparentemente estos no se hallarían, ya que el conjunto de pequeñas alteraciones sufridas por los distintos genes involucrados en una determinada función, en última instancia, puede aportar el peso suficiente para implicar una alteración significativa de la misma.

Siguiendo esta misma estrategia existe también el *Canonical Circuit Activity Analysis* (CCAA) [51], que tendría en cuenta el conjunto de genes implicados en una misma ruta metabólica y el efecto que tienen las alteraciones sufridas por estos en el resultado final de dicha ruta. Así, sería posible saber si, al someter al organismo a una determinada condición, una ruta metabólica vería incrementada o disminuida su activación.

Así, como resultado de dicho análisis sería posible saber si una determinada ruta ve incrementada o disminuida su producción al someter al organismo a una determinada condición.

### **1.2.3. Metaanálisis**

Originalmente nacido entre las ciencias sociales [52], el metaanálisis es una herramienta que en años recientes ha demostrado su utilidad en el campo de las ciencias médicas. Esta técnica se resume en la revisión y agrupación de los resultados de distintos estudios sobre una misma temática, de forma que, al incrementarse la muestra disponible, los resultados obtenidos sean más robustos a nivel estadístico [53, 54]. La combinación de resultados permite, además, abordar estudios que presentan resultados en principio contradictorios, eliminar el ruido de fondo causado por la plataforma usada y el diseño experimental, o incluso dar significado estadístico a caracteres analizados que por separado no lo tendrían. La versatilidad de esta técnica también hace posible realizarla tanto a nivel de transcrito, con los resultados de un análisis de expresión diferencial, como a nivel funcional, con los resultados de un análisis de enriquecimiento funcional [44].

## 2. Objetivos

Debido a la alta prevalencia del SDA en la población, cualquier información nueva sobre sus mecanismos de acción en el organismo puede ser de gran importancia para la sociedad. Una mejor comprensión de esta adicción permitiría el desarrollo de nuevos tratamientos o la mejora de los ya existentes. En este sentido, las observaciones realizadas sobre las diferencias entre hombres y mujeres en esta enfermedad sugerirían la implicación de mecanismos genéticos hasta ahora poco estudiados. Un mayor conocimiento de dichos mecanismos será relevante a la hora de enfocar el tratamiento a realizar o los factores de riesgo a tener en cuenta.

Así mismo, y teniendo en cuenta la importancia del SDA como problema social, este trabajo tiene como objetivo la identificación de los factores y mecanismos biológicos que se ven afectados diferencialmente en hombres y mujeres que sufren SDA. Dicho objetivo será llevado a cabo mediante un abordaje *in silico*.

### 3. Materiales y métodos

Todos los procesos de análisis bioinformático han sido llevados a cabo usando la versión 3.5.1 del lenguaje de programación R [55]. Todas las librerías y paquetes que han sido usados en cada uno de los pasos se encuentran detallados en la tabla B.1 del anexo b de tablas.

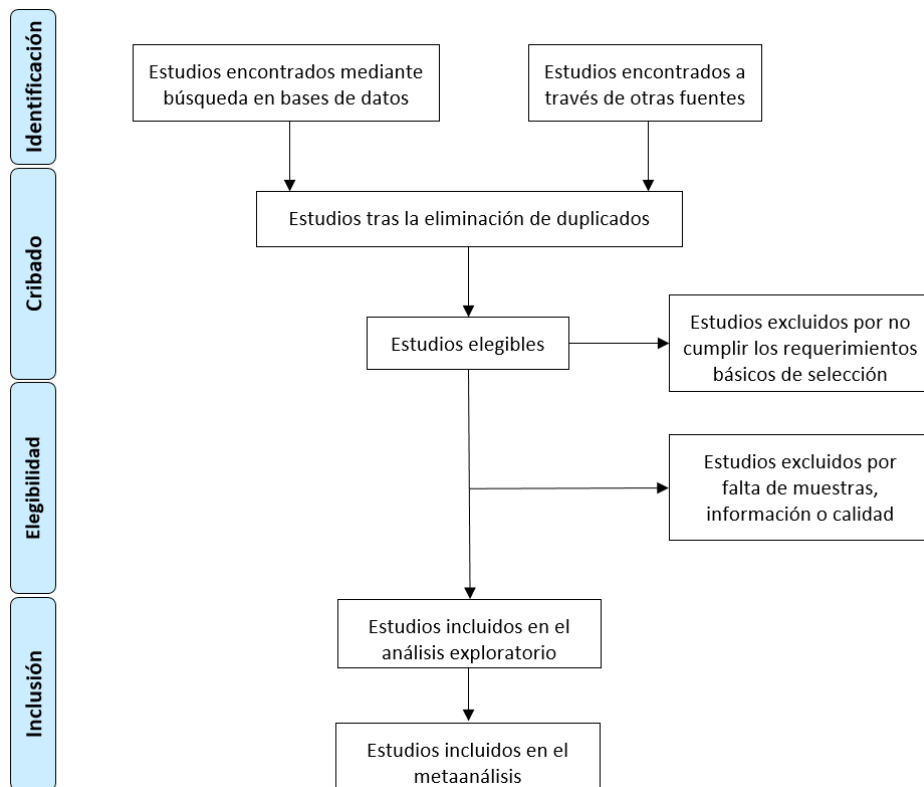
#### 3.1 Revisión sistemática y selección de estudios

La revisión sistemática es un método mediante el cual se coteja toda la información publicada acerca de un determinado tema que cumple unos criterios de selección concretos, con el objetivo de dar respuesta a una cuestión de interés. Para la correcta realización de dicha revisión es necesario tener unos objetivos definidos, que guían la búsqueda de los estudios que cumplan con los criterios ya establecidos. Una vez encontrados dichos estudios es necesario comprobar que cumplen unos estándares de validez, también establecidos previamente [54]. Para la realización de este trabajo se han seguido las directrices establecidas por la declaración PRISMA, nacida de la colaboración entre investigadores de distintas disciplinas para estandarizar los protocolos a seguir a la hora de realizar una revisión sistemática y un metaanálisis [54] (figura 3.1).

En primer lugar, se realizó una búsqueda exhaustiva de todos los estudios disponibles en bases de datos públicas que trataran el SDA desde un punto de vista transcriptómico. Las bases de datos revisadas fueron GEO [56] y ArrayExpress [57], y se usaron diversas palabras clave para la búsqueda: *transcriptomics*, *alcoholism*, *alcohol abuse*, *alcohol dependence*, *alcohol*, *ethanol*, *Alcohol use disorder* y *Homo sapiens*.

De los estudios resultantes de dicha búsqueda hizo falta seleccionar manualmente aquellos que se centraran realmente en el estudio del SDA, pues una importante proporción de los mismos solamente hacían referencia a dicho síndrome por estar relacionado con su objetivo principal. Posteriormente, a partir de dicha lista fueron seleccionados los estudios que contenían información acerca del sexo de los sujetos, que no hubiesen sido llevados a cabo sobre líneas celulares, que incluyesen un grupo control y cuyo tamaño muestral fuese superior o igual a tres para cada una de las condiciones consideradas.

Finalmente fueron seleccionados cuatro estudios, todos ellos pertenecientes a la base de datos GEO. Los datos de dichos estudios fueron obtenidos gracias al paquete *GEOquery* [58].



**Figura 3.1:** Esquema de las distintas fases del flujo de trabajo de una revisión sistemática [54].

## 3.2 Análisis individual de los estudios

Antes de proceder al metaanálisis se llevó a cabo una estrategia de análisis para cada estudio de forma individual, que incluyó el procesamiento y análisis exploratorio de los datos, la detección de genes diferencialmente expresados, y su caracterización funcional.

La aplicación de dicha estrategia fue necesaria para la generación y estandarización de los resultados que fueron posteriormente combinados en el metaanálisis.

### 3.2.1 Procesamiento de los datos

#### Estandarización de la nomenclatura

Debido a las considerables diferencias en el diseño experimental y en los métodos usados en cada uno de los estudios, fue necesario llevar a cabo un proceso de estandarización de la nomenclatura usada; para así evitar problemas al llevar a cabo el metaanálisis. En la estandarización se tuvieron en cuenta dos puntos principales:

- Variable **Estado**: Determina cómo se clasifican los sujetos según si sufren SDA o no. Se clasificaron en “Alcoholic” o “Control” según si sufrían algún grado de SDA o no, respectivamente

- Variable **Sexo**: Determina el sexo de los sujetos, clasificados como “Male” o “Female”

También se estandarizó la nomenclatura usada en otros factores presentes en algunos, pero no todos, los estudios usados: edad, etnia, tabaquismo y ciertos factores relacionados con la recogida de la muestra.

### Estandarización de la anotación de las sondas

La nomenclatura usada para identificar las sondas de un microarray es un punto clave a la hora de procesar los datos de un estudio transcriptómico. Debido a que cada uno de los estudios usados en este trabajo fueron realizados en una plataforma distinta se optó por estandarizar la anotación de todos ellos a un código común, el código Entrez, que sirve como identificador de los genes y secuencias en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) [59].

En algunos casos se observaron sondas de un mismo chip diseñadas para hibridar con distintas secuencias pertenecientes a un mismo gen. Estas sondas causaban la aparición de redundancias al convertir la anotación de los estudios originales a Entrez, teniendo un mismo gen distintas mediciones. Para solventar dicha redundancia se recurrió a sustituir los valores de todas las sondas con un mismo código por la mediana de dichos valores para cada una de las muestras. Para completar la depuración de los datos también se eliminaron las sondas cuyo valor de expresión se encontraba ausente en una proporción considerable de las muestras de un mismo estudio

### **3.2.2. Análisis exploratorio**

Una vez estandarizada la nomenclatura de los estudios y depuradas las redundancias en sus valores de expresión se procedió a realizar un análisis exploratorio de cada uno de los estudios. El objetivo de dichos análisis era observar si la distribución del perfil de expresión de las muestras seguía algún patrón relacionado con las variables de interés, además de detectar si alguna de las muestras presentaba un comportamiento anómalo.

Para evitar la aparición de nuevos sesgos se recurrió al uso de los datos normalizados de los estudios. Dicha normalización se comprobó representando los valores de expresión de todas las muestras de cada estudio en diagramas de cajas, que sirvieron también para detectar la presencia de valores de expresión anómalos.

Para determinar el patrón que seguían las muestras de los estudios al agruparse se procedió a realizar un análisis cluster. Se usaron tanto la distancia de correlación como la distancia euclídea para medir el patrón de distribución de las muestras. Siguiendo este mismo objetivo se llevó a cabo también un análisis de componentes principales con cada estudio.

Mediante la realización de estos análisis exploratorios fue posible identificar nuevas fuentes de sesgo en algunos estudios, como el efecto batch, que fueron corregidas para la correcta interpretación de los datos analizados. También se observaron, en dos de los estudios, muestras que habían sido tomadas bajo

condiciones alteradas que podían añadir ruido a los resultados y que, por tanto, fueron eliminadas de los análisis a partir de dicho punto.

### 3.2.3 Análisis de expresión diferencial

Para llevar a cabo el análisis de expresión diferencial se realizó una comparación entre mujeres con SDA (MA) y mujeres control (MC), cuyos resultados fueron comparados con los obtenidos por otra comparación realizada entre hombres con SDA (HA) y hombres control (HC), resultando en el siguiente contraste:

#### **(Mujeres con SDA - Mujeres Control) - (Hombres con SDA - Hombres Control)**

Dichas comparaciones fueron posibles mediante la combinación de las variables “Estado” y “Sexo” en una nueva variable, que agrupa los cuatro posibles niveles a comparar. Otras variables se tuvieron también en cuenta en el momento de realizar los análisis para evitar la creación de sesgos en los resultados de la comparación. Se usaron las funciones de la librería de R *limma*, con las que se creó una matriz de contrastes y se ajustó, para cada gen, un modelo lineal. Se calcularon los coeficientes estimados y errores estándar a partir de la matriz y el modelo lineal generados y, posteriormente, los estadísticos de la expresión diferencial. Entre estos estadísticos se tomaron los p-valores de todos los genes, que fueron ajustados usando el método de Benjamini y Hochberg (BH) [60].

### 3.2.4. Análisis de enriquecimiento funcional

Tras obtener los resultados de los análisis de expresión diferencial el siguiente paso fue la realización de un análisis de enriquecimiento funcional sobre cada uno de los estudios usando el método GSEA [50], usando la librería de R *mdgsa* [61].

En primer lugar, se llevó a cabo el enriquecimiento funcional de los términos GO asociados con los genes de los estudios. Para ello el primer paso fue realizar una correspondencia entre los identificadores Entrez de los que se disponía y los términos GO asociados con estos; proceso en el que se recurrió a la librería de R *biomaRt* [62]. Para este análisis se tuvieron en cuenta las tres ontologías comprendidas en la base de datos de GO: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares. Adicionalmente, se llevó a cabo un proceso de propagación, mediante el cual se añadieron a todos los genes los términos GO posicionados jerárquicamente por encima de aquellos que tenían directamente asociados.

Así, una vez obtenidos tanto los términos GO asociados con cada gen como sus estadísticos resultantes del análisis de expresión diferencial, se procedió a ordenar los mismos según su p-valor y el valor de su estadístico de contraste. Dicha clasificación fue posteriormente transformada y su distribución adecuada a una variable independiente de un modelo de regresión logística univariante, a partir del cual se realizó el análisis de enriquecimiento funcional. Se consideraron estadísticamente significativos los términos GO cuyo p-valor ajustado mediante el método BH era menor a 0'05.

Se repitió el mismo proceso para las rutas metabólicas de KEGG, con la diferencia de que, al no encontrarse esta base de datos organizada jerárquicamente, no se realizó una propagación de los términos antes de llevar a cabo el análisis.

### **3.2.5 Análisis de las rutas de señalización**

Para llevar a cabo el análisis de las rutas de señalización se recurrió a la herramienta *Hipathia* [51], que usa el método CCAA para analizar la actividad de las rutas, extraídas de la base de datos KEGG; permitiendo así modelar la señalización celular de los estudios analizados a partir de la información sobre transducción de señales y transcriptómica de que se dispone. Este método puede aproximar la intensidad de la señal que recibe un nodo de una red de señalización a partir de los niveles de expresión del gen directamente relacionado con dicho nodo y de aquellos que influyen sobre el mismo, que determinan la intensidad de la señal que recibe el mismo. Con este método es posible estimar la intensidad con la que se expresan los genes implicados en la parte final de dichas rutas de señalización, y en consecuencia conocer los niveles de actividad de las funciones y procesos que se asocian con los mismos. A su vez, debido a que muchas rutas tienen diversos nodos finales, este método también es capaz de dividir dichas rutas en subrutas, cada una con un único nodo efector y todos los nodos que llevan hasta el mismo.

Uno de los pasos necesarios para realizar este análisis fue la conversión de todos los valores de expresión a valores comprendidos entre 0 y 1; seguido del cálculo del nivel de activación de cada subruta para cada muestra. Dichos resultados, finalmente, fueron comparados de forma similar al proceso seguido en el análisis de expresión diferencial mediante el paquete de R *limma*.

## **3.3 Metaanálisis**

Una vez obtenidos los resultados de los análisis de cada estudio individual se procedió a combinar estos y realizar los metaanálisis necesarios. Se recurrió a los resultados de los estudios de enriquecimiento funcional, de los cuales se tomaron, de cada término evaluado, los valores de los logaritmos de los *odds ratio* y su varianza. Dichas medidas fueron condensadas en dos matrices únicas, que fueron revisadas en busca de valores anómalos y para comprobar la cantidad de valores perdidos en el proceso de condensación, en el cual se eliminan las funciones que no se encuentran presentes en al menos dos de los estudios a unificar [44].

### **3.3.1 Determinación de la medida combinada del efecto**

Debido a la gran cantidad de términos a analizar, se decidió cuál era el modelo más apropiado para estimar la variabilidad del efecto a posteriori. La decisión de recurrir al uso de un modelo u otro se toma, normalmente, analizando la heterogeneidad de los estudios que están siendo agrupados en el metaanálisis, que hace referencia a la diversidad de los datos y métodos del estudio, que a su vez influyen en gran medida sobre los efectos que se evalúan [44, 63].

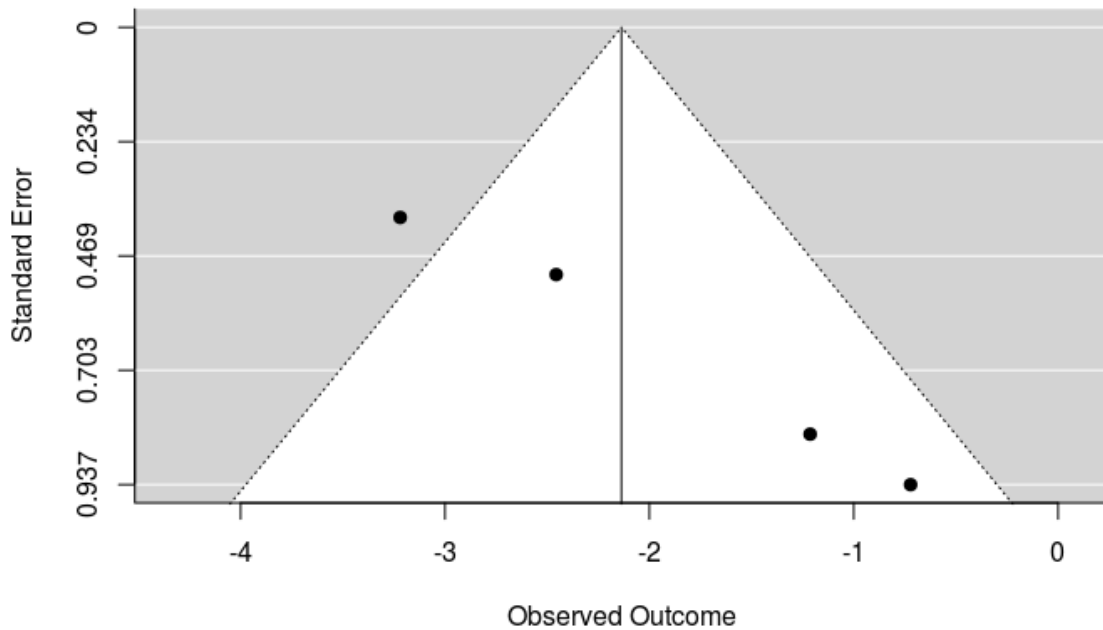
Todos los metaanálisis se realizaron gracias a las funciones de las librerías de R *metafor* [64] y *mdgsa*. Se realizaron todos los metaanálisis siguiendo el modelo de efectos fijos (FE), y los modelos de efectos aleatorios de DerSimonian y Laird (DL) [65], Hedges (HE) [66], Hunter y Schmidt (HS) [67], Sidik-Jonkman (SJ) [68] y Empirical Bayes (EB) [69]. De entre todos estos métodos finalmente se decidió optar por DL, ya que su funcionamiento se ajusta mejor al uso de datos ómicos y la diversidad de plataformas características de este estudio.

El resultado del metaanálisis de cada función incluye un conjunto de indicadores de heterogeneidad y de estimadores de la medida del efecto combinado:

- **QE y QEp:** estadístico de contraste y p-valor, respectivamente, del método DL. Sirven para la detección de heterogeneidad entre los distintos estudios sintetizados. La hipótesis nula indica un grupo de estudios homogéneo.
- **LOR:** estimación del efecto combinado de todos los estudios sintetizados. El signo indica en cuál de los grupos comparados se encuentra sobrerrepresentada la función analizada, encontrándose la sobrerrepresentación en el primer grupo si su signo es positivo y en el segundo si este es negativo. La magnitud del valor es un indicador cuantitativo de dicha sobrerrepresentación.
- **Intervalo de confianza del LOR (al 95%):** Indica la variabilidad estimada para dicho LOR en el modelo seleccionado. Si este intervalo no incluye el 0, el LOR se considera significativo.
- **p-valor:** indica el nivel de significación del efecto combinado. Al no contemplar los múltiples análisis realizados es necesario realizar un ajuste del mismo mediante el método BH.
- **$\tau^2$ :** describe la heterogeneidad entre los estudios.
- **$I^2$ :** indica el porcentaje de variabilidad debida a la heterogeneidad en los estudios. Cuanto menor sea, menos relevante es dicha heterogeneidad.
- **$H^2$ :** cociente entre la variabilidad total y la variabilidad en el muestreo.

### 3.3.2. Evaluación de la heterogeneidad

Debido a la baja potencia que presenta el test Q del método DL al trabajar con pocos estudios, es necesario complementar sus análisis de heterogeneidad con métodos como los gráficos de embudo [44]. Dichos gráficos evalúan la variabilidad de los diferentes estudios usados para los metaanálisis en busca de posibles sesgos. Representan esto como la magnitud del efecto medio (eje horizontal) contra la medida de precisión (eje vertical), como la desviación estándar o la inversa de la varianza.

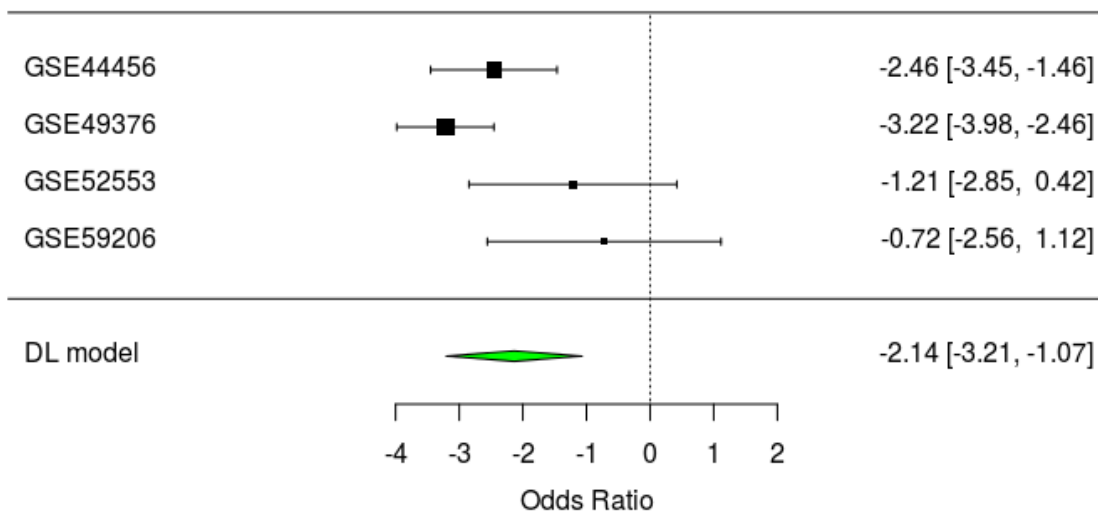


**Figura 3.2:** Ejemplo de un gráfico de embudo. Cada punto representa el valor del factor estudiado dentro de cada uno de los estudios seleccionados para el metaanálisis en relación al resultado de dicho metaanálisis, que determina las características de la figura central.

### 3.3.3. Representación de los resultados

Además de representar los resultados del propio metaanálisis, también se realizaron gráficos de bosque para cada una de las funciones analizadas. Dichos gráficos permiten comparar el peso del resultado de cada función en cada estudio individual con el resultado obtenido en el metaanálisis de dicha función [44].

En los gráficos de bosque, a la izquierda están representados los distintos estudios incluidos en el metaanálisis, y a la derecha la estimación de la medida resumen individual de cada uno de estos, con un intervalo de confianza al 95%. En la parte central se representa la medida del efecto y su intervalo de confianza, siendo este proporcional al tamaño del cuadrado de la precisión de las estimaciones. En la parte inferior central se muestra el resultado del metaanálisis, posicionado respecto a la línea de efecto nulo según si se trata de un resultado significativo y del grupo comparado donde dicha función se encuentra sobrerrepresentada. Por último, en la esquina inferior izquierda se indica el modelo de análisis que se ha empleado, siendo en este caso DL, y en la esquina inferior derecha el intervalo de confianza al 95%.



**Figura 3.3:** Ejemplo de un gráfico de bosque. Cada línea representa el valor del factor estudiado dentro de cada uno de los estudios seleccionados para el metaanálisis, y su intervalo de confianza, en relación al resultado de dicho metaanálisis, representado en la figura inferior.

## 4. Resultados

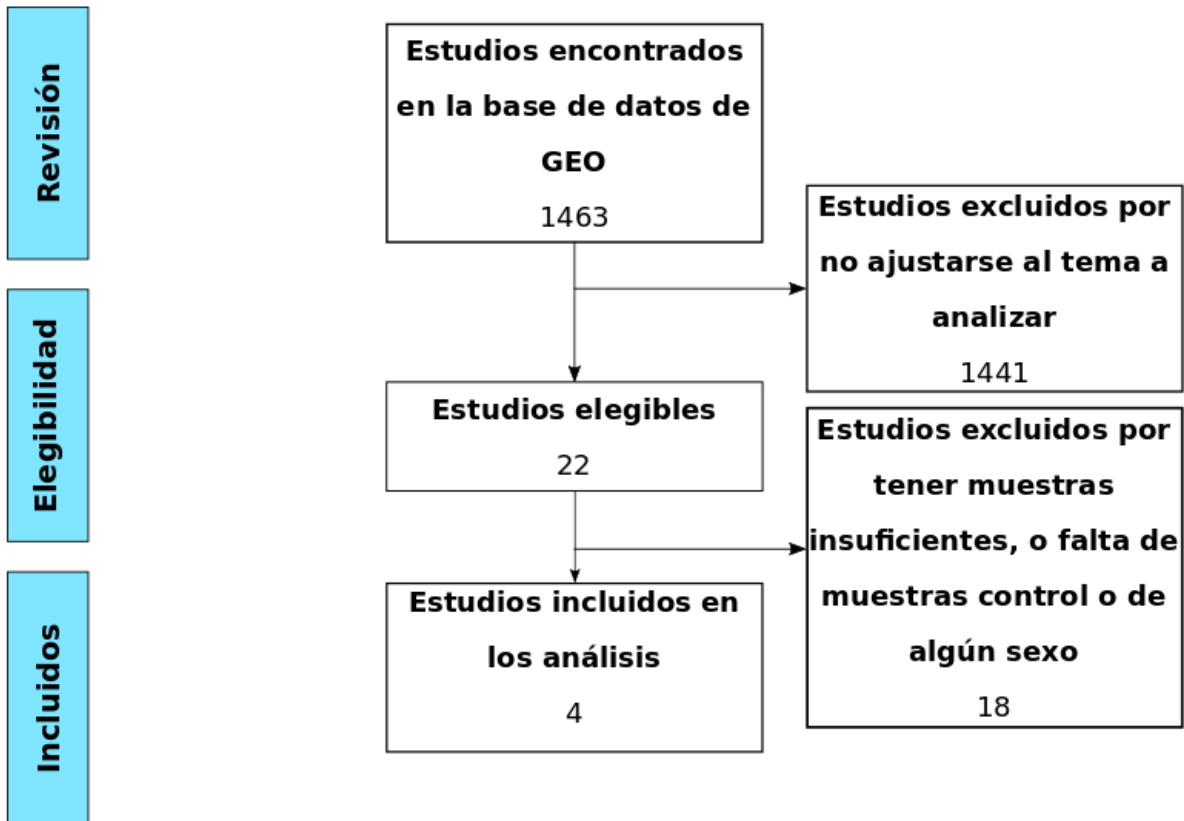
Los resultados se presentarán siguiendo el orden ya establecido en el apartado de Material y Métodos. A parte de algunas representaciones de ejemplo, las tablas y figuras complementarias se encuentran en los anexos correspondientes.

### 4.1. Revisión sistemática

Durante la revisión sistemática se encontró un total de 1463 estudios que cumplían los parámetros iniciales de búsqueda. Tras su evaluación, la mayoría de los estudios fueron descartados, pues no estaban centrados directamente en el SDA; haciendo muchos estudios referencia al síndrome sólo tangencialmente, sin llegar a tratarlo realmente, o centrándose en otros síndromes relacionados con el abuso del alcohol, como el Síndrome Alcohólico Fetal. Tras esta primera selección se mantuvieron 22 estudios, de entre los cuales fueron eliminados aquellos que carecían de información sobre el sexo de las muestras o no tenían muestras suficientes para cualquiera de las condiciones de interés, siendo el mínimo 5. También fueron eliminados aquellos que no incluían muestras control. Finalmente se conservaron 4 estudios que han sido utilizados para el metaanálisis.

**Tabla 4.1:** Estudios seleccionados para los análisis tras realizar la revisión sistemática. Se indica la plataforma usada y la cita asociada a los mismos.

Estudio	Plataforma	Cita
GSE44456	Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array	70
GSE49376	Illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip	71
GSE52553	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	72
GSE59206	Illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip	73

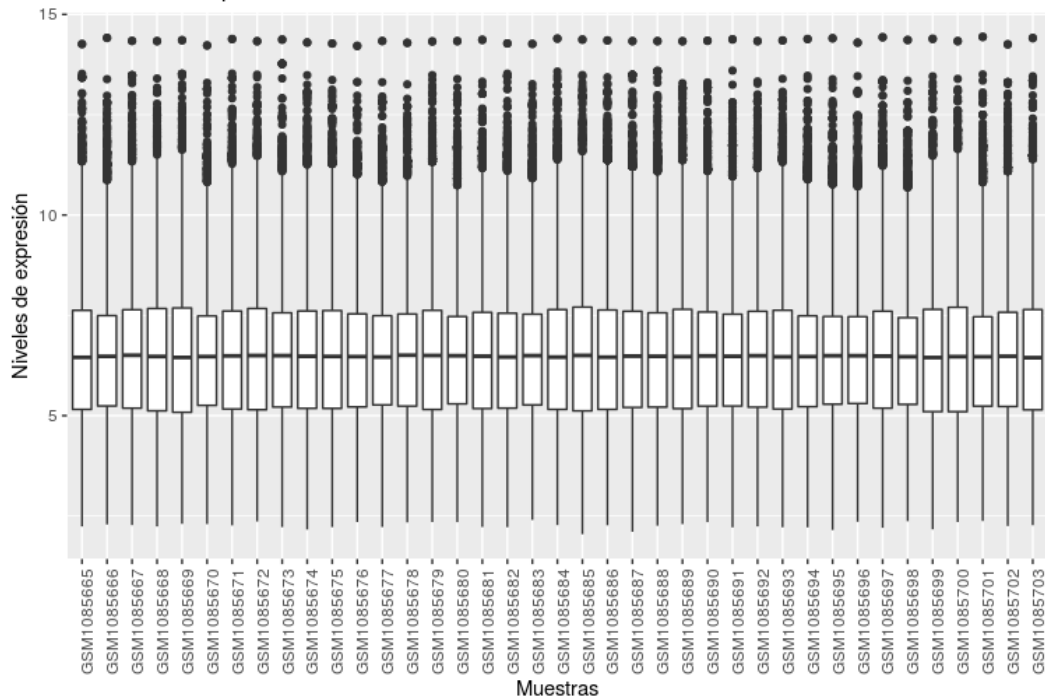


**Figura 4.1:** Diagrama del flujo durante la revisión sistemática de este trabajo, basado en la declaración PRISMA. Se han sintetizado pasos debido a la posibilidad de realizarlos simultáneamente.

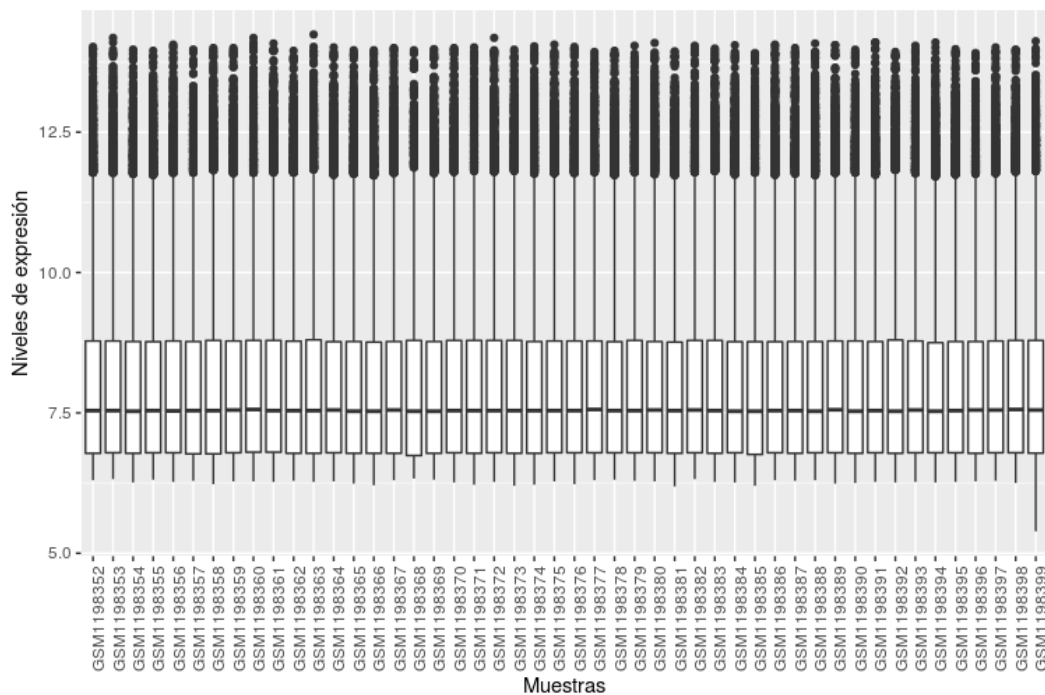
## 4.2. Análisis individual de los estudios

### 4.2.1. Análisis exploratorio

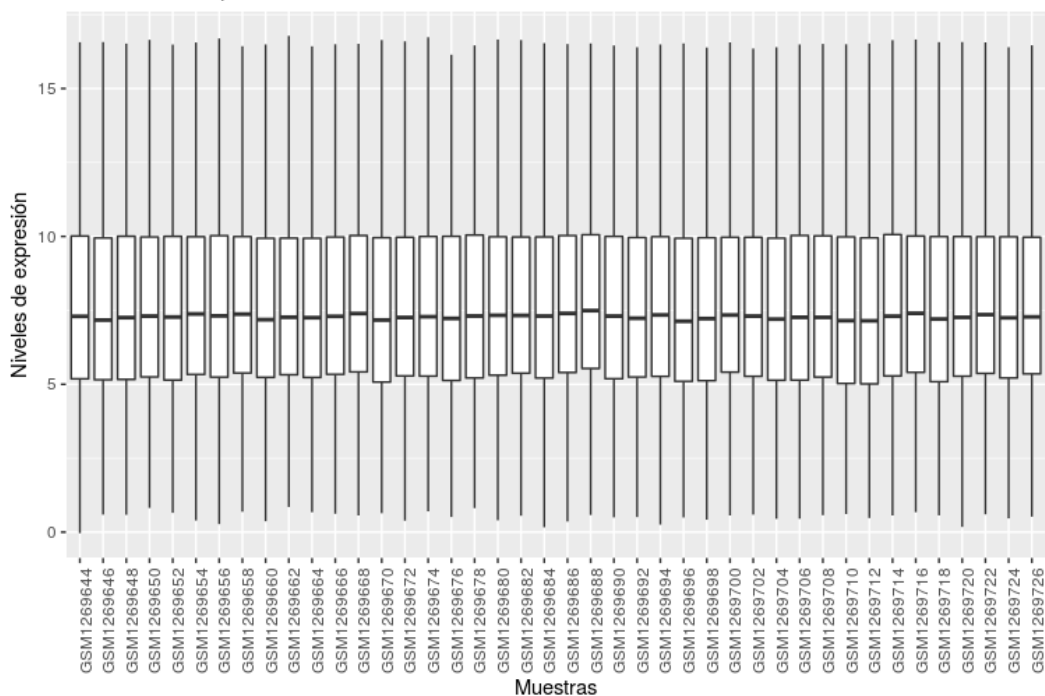
Después de obtener los datos de cada estudio y estandarizar su nomenclatura se procedió a evaluar la normalización de los valores de expresión de los distintos estudios mediante diagramas de cajas (figuras 4.2-4.5).



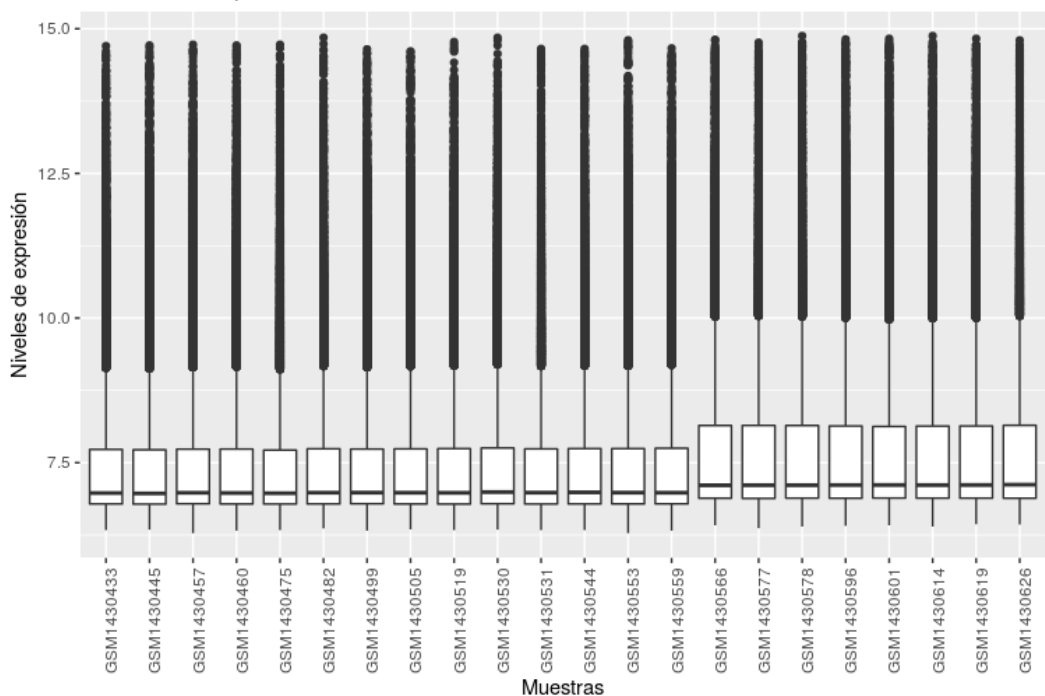
**Figura 4.2:** Diagrama de cajas representando los valores normalizados de todas las muestras usadas en el estudio GSE44456 [70].



**Figura 4.3:** Diagrama de cajas representando los valores normalizados de todas las muestras usadas en el estudio GSE49376 [71].



**Figura 4.4:** Diagrama de cajas representando los valores normalizados de todas las muestras usadas en el estudio GSE52553 [72].



**Figura 4.5:** Diagrama de cajas representando los valores normalizados de todas las muestras usadas en el estudio GSE59206 [73].

Tras corregir el efecto batch observado en uno de los estudios (figura 4.5), y usando como referencia estos datos normalizados, se realizó una observación de la cantidad de sujetos de cada sexo y condición (Control o SDA) de cada uno de los estudios (figura 4.6).

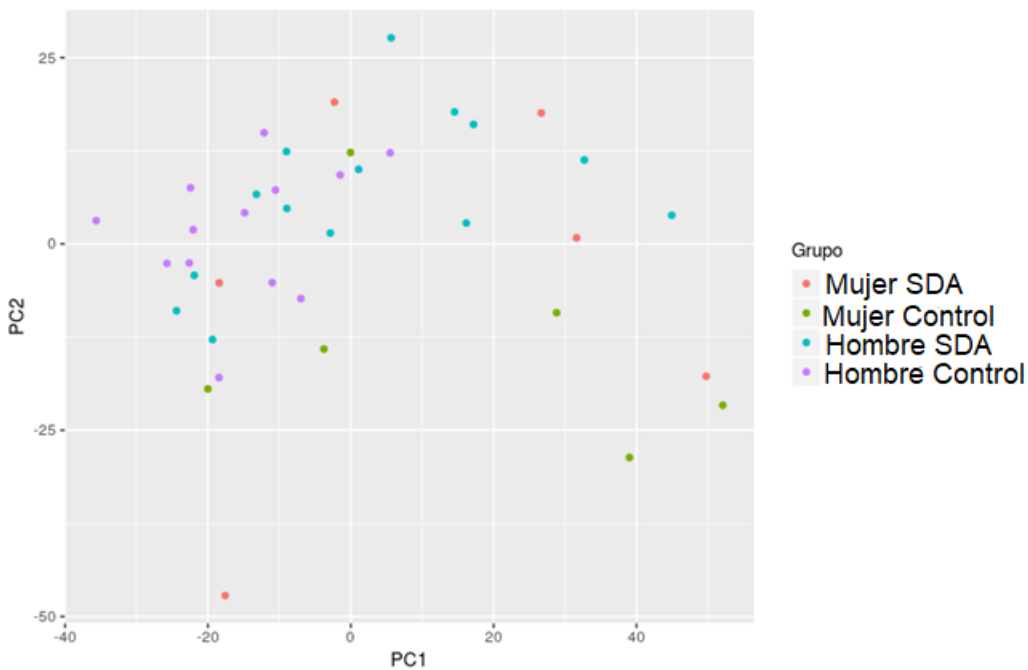


**Figura 4.6:** Número de sujetos de cada sexo (color) y condición (columna) presentes en cada uno de los estudios analizados.

## GSE44456

En este estudio [70] se buscaron las alteraciones que causa el SDA en la expresión génica del hipocampo a partir de muestras de ascendencia europea del *New South Wales Tissue Resource Centre*, en Australia. Se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial, pero no se observaron interacciones entre sexo y el SDA. En el diseño de este estudio se tuvieron en cuenta también otros factores, como por ejemplo si el sujeto sufría cirrosis o si fumaba.

Al realizar los análisis exploratorios pertinentes no se observa una agrupación de las muestras según sexo ni condición de la enfermedad (figura 4.7).



**Figura 4.7:** Gráfico representando los resultados del análisis de componentes principales realizado sobre las muestras del estudio GSE44456.

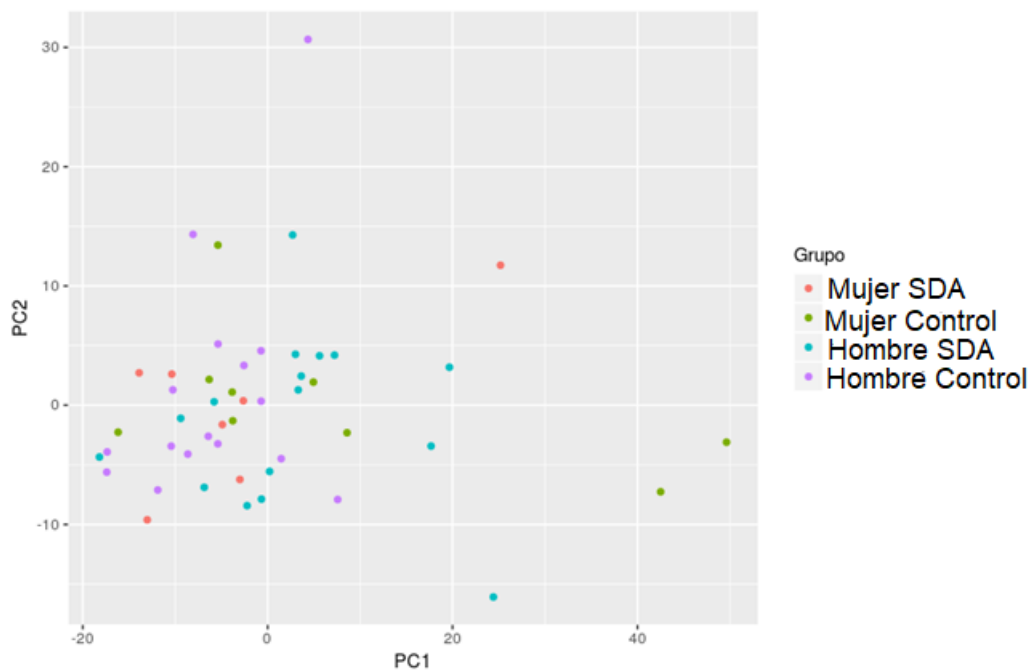
**Tabla 4.2:** Agrupación de las muestras del estudio GSE44456 según sexo y condición de la enfermedad.

	Hombres	Mujeres	Total
Control	13	6	19
SDA	14	6	20
Total	27	12	39

## GSE49376

En este estudio [71] se buscaron diferencias tanto a nivel del metiloma como del transcriptoma entre sexos en el córtex prefrontal. Adicionalmente, se tuvo en cuenta como factor la presencia de sujetos con SDA, aunque dicho factor no se encontrase entre los objetivos del estudio. El estudio se llevó a cabo a partir de muestras de ascendencia europea del *New South Wales Tissue Resource Centre*, en Australia. En este caso todos los análisis realizados en el estudio se centraron en el sexo, sin tener en cuenta el efecto del SDA sobre los sujetos. Por tanto, se consideraron como niveles distintos el Abuso del Alcohol y la Dependencia del Alcohol, aunque de cara a los análisis realizados se optó por crear un grupo conjunto bajo la definición de SDA, siguiendo el criterio del DSM-5 [4].

Al realizar los análisis exploratorios pertinentes no se observa una agrupación de las muestras según sexo ni condición de la enfermedad (figura 4.8).



**Figura 4.8:** Gráfico representando los resultados del análisis de componentes principales realizado sobre las muestras del estudio GSE49376.

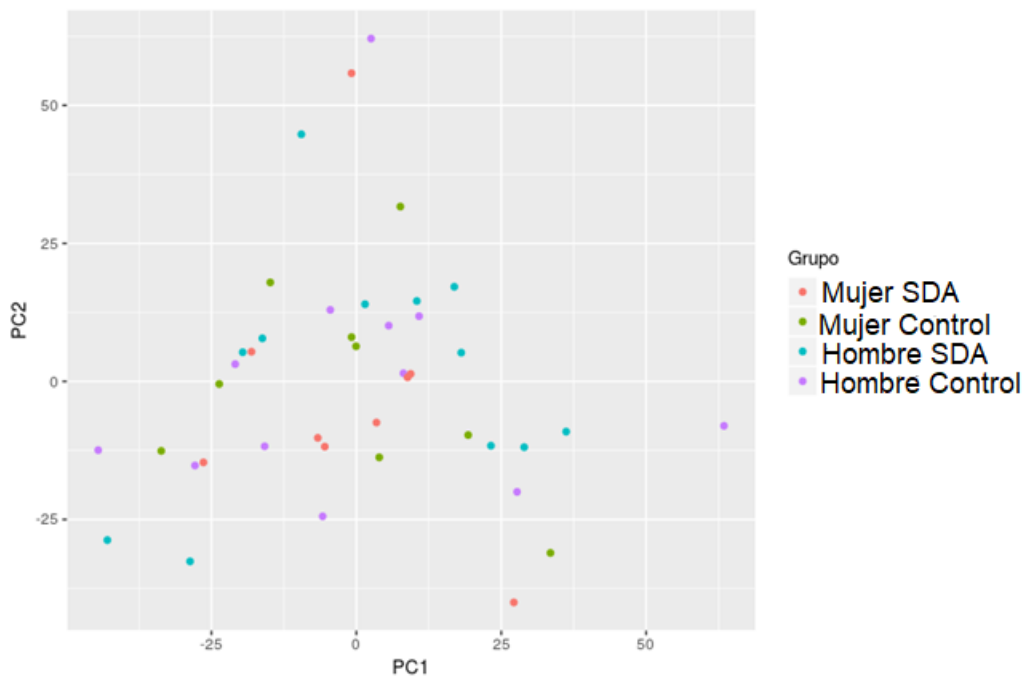
**Tabla 4.3:** Agrupación de las muestras del estudio GSE49376 según sexo y condición de la enfermedad.

	Hombres	Mujeres	Total
Control	16	9	25
SDA	16	7	23
Total	32	16	48

## GSE52553

En este estudio [72] se buscaba observar si la exposición al etanol es capaz de alterar el transcriptoma en linfoblastos. Dichos linfoblastos fueron extraídos de sujetos controles y con SDA, pertenecientes a ambos sexos. Posteriormente fueron inmortalizados para conseguir líneas celulares linfoblastoides. Dichas líneas celulares posteriormente fueron sometidas a tratamientos control y con etanol. Aunque los análisis llevados a cabo se centraron en el efecto del etanol como sustancia química en contacto con las células, también se tuvieron en cuenta el sexo de los sujetos y si sufrían SDA. Para evitar sesgos, de este estudio se tomaron solamente las muestras que no habían sido sometidas a un tratamiento posterior con etanol.

Al realizar los análisis exploratorios pertinentes no se observa una agrupación de las muestras según sexo ni condición de la enfermedad (figura 4.9).



**Figura 4.9:** Gráfico representando los resultados del análisis de componentes principales realizado sobre las muestras del estudio GSE52553.

**Tabla 4.4:** Agrupación de las muestras del estudio GSE52553 según sexo y condición de la enfermedad.

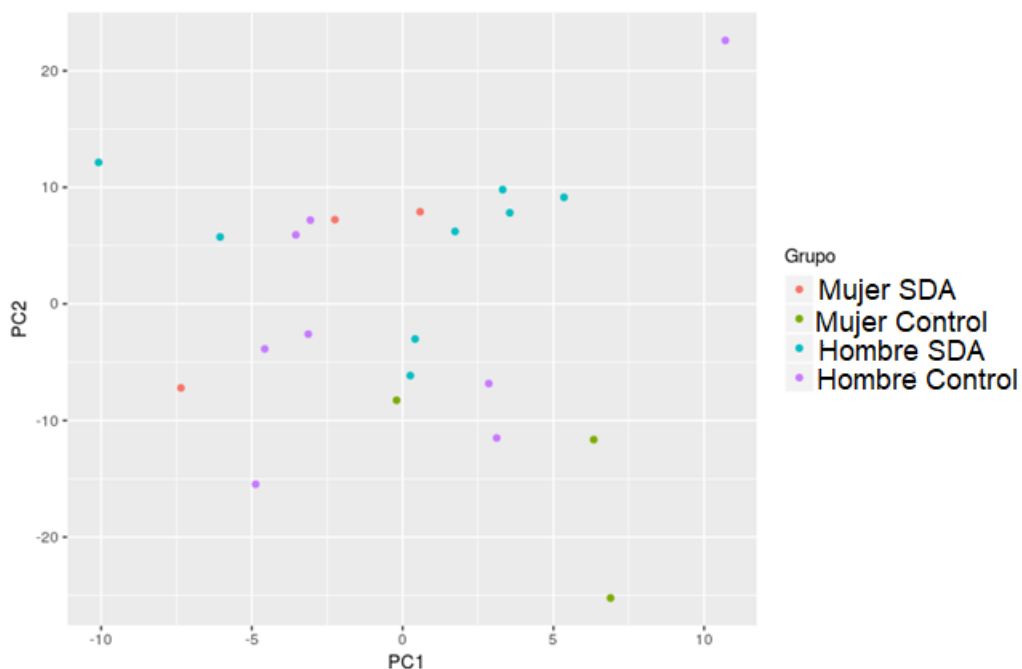
	Hombres	Mujeres	Total
Control	12	9	21
SDA	12	9	21
Total	24	18	42

## GSE59206

En este estudio [73] se buscaron posibles alteraciones en el transcriptoma debidas a estrés, además de ver si dicho estrés favorecía un mayor consumo de alcohol. Para ello se tomaron muestras de sangre de diversos sujetos en tres situaciones distintas: al ser expuestos a imágenes neutras, a imágenes estresantes no relacionadas con el alcohol y a imágenes relacionadas con el alcohol. En cada una de estas situaciones se tomaron muestras de sangre antes del estímulo, justo después del estímulo, y dos horas después del estímulo; resultando así en un total de 9 muestras por sujeto. De entre todas estas muestras se decidió seleccionar solamente aquellas tomadas antes de someter a los sujetos al estímulo pertinente, y haciendo la mediana de las mismas para conseguir un único valor por sujeto.

Adicionalmente, durante el diseño de este estudio se insistió en el reclutamiento de sujetos que no presentaran dependencia del alcohol, separando a los sujetos en “Bebedores medios” y “Muy bebedores” según el número de bebidas que tomaban por semana. No obstante, dicho criterio estaba basado en el DSM-4; y según los criterios del estudio para separar los grupos, y siguiendo el consejo de un profesional experto en el campo, si se aplicaran los criterios del DSM-5 sería pertinente considerar a los sujetos del grupo “Bebedores medios” como controles y a los del grupo “Muy bebedores” como SDA.

Al realizar los análisis exploratorios pertinentes no se observa una agrupación de las muestras según sexo ni condición de la enfermedad (figura 4.10).



**Figura 4.10:** Gráfico representando los resultados del análisis de componentes principales realizado sobre las muestras del estudio GSE59206.

**Tabla 4.5:** Agrupación de las muestras del estudio GSE59206 según sexo y condición de la enfermedad.

	Hombres	Mujeres	Total
Control	8	3	11
SDA	8	3	11
Total	16	6	22

#### 4.2.2. Análisis de expresión diferencial

Además de la comparación de interés para el estudio ya expuesta, (MA-MC)-(HA-HC), también se realizaron comparaciones entre Mujeres control y Hombres control (MC-HC), Mujeres con SDA y Hombres con SDA (MA-HA), Mujeres con SDA y Mujeres control (MA-MC), y Hombres con SDA y Hombres control (HA-HC). En la tabla 4.6 se muestran los resultados estadísticamente significativos ( $p$ -valor ajustado con BH  $<0.05$ ) de todas estas comparaciones, representándose como Up aquellos genes sobrerrepresentados por la condición positiva de la ecuación y como Down aquellos sobrerrepresentados por la condición negativa de la misma.

Por la naturaleza de la comparación principal llevada a cabo entre condiciones: (MA-MC)-(HA-HC); tanto en este análisis como en otros posteriores, es importante matizar que los genes o términos adjudicados a cada una de las condiciones pueden deberse, o bien a un aumento de la expresión en un sexo cuyos sujetos sufren SDA, o bien a una disminución de la expresión en el otro sexo cuando son sus sujetos los que sufren dicha enfermedad, caso que causaría una sobreexpresión indirecta de los genes o términos mostrados para una determinada condición.

**Tabla 4.6:** Genes diferencialmente expresados en cada uno de los estudios (filas) según la comparación realizada entre las distintas condiciones (columnas), siendo estas: Mujeres con SDA (MA), Mujeres Control (MC), Hombres con SDA (HA), Hombres Control (HC). Los resultados se han ordenado según en qué condición están sobreexpresados: Up para los sobreexpresados en las condiciones en positivo y Down para los sobreexpresados en las condiciones en negativo.

		(MA-MC)-(HA-HC)	MC-HC	MA-HA	MA-MC	HA-HC
GSE44456	Up	0	164	2	0	0
	Down	0	540	11	0	0
	<b>Total</b>	0	704	13	0	0
GSE49376	Up	0	15	2	0	0
	Down	0	6	11	0	0
	<b>Total</b>	0	21	13	0	0
GSE52553	Up	0	3	2	0	0
	Down	0	10	10	0	0
	<b>Total</b>	0	13	12	0	0
GSE59206	Up	0	1	1	0	0
	Down	0	5	5	0	0
	<b>Total</b>	0	6	6	0	0

En ningún caso se observaron resultados significativos en la comparación de interés, apareciendo éstos solamente al comparar ambos sexos dentro de una misma condición para la enfermedad.

Además de comparar sexos y condición de SDA también se intentó observar si la aparición de la menopausia en las mujeres podía ser un factor relevante en los niveles de expresión, pero este factor solamente se había tenido en cuenta en 3 de los 4 estudios analizados. En estos, además, la variabilidad que presentaba este factor estaba bastante limitada, sin indicar siquiera si se trataba de sujetos menopáusicos. Tanto es así que las cohortes de los distintos estudios no llegaban a solaparse siquiera, imposibilitando el uso de dicho factor para la realización de un metaanálisis específico. Por lo tanto, este acercamiento fue descartado.

### 4.2.3. Análisis de enriquecimiento funcional

De forma similar a los resultados del análisis de expresión diferencial, los resultados del análisis de expresión diferencial se representan también en una tabla según si se encuentran sobrerrepresentados en una de las condiciones comparadas o la otra. Los términos se encuentran separados según a qué ontología de GO pertenecen, o si son rutas KEGG. La base de datos de GO contiene tres ontologías distintas: Procesos biológicos (BP), Componentes celulares (CC) y Funciones moleculares (MF).

**Tabla 4.7:** Funciones de la ontología GO de procesos biológicos expresadas diferencialmente en cada uno de los estudios tras llevar a cabo el enriquecimiento funcional de los resultados obtenidos con la comparación: (MA-MC)-(HA-HC). Los resultados se han ordenado según en cuál de las condiciones comparadas se encuentran sobreexpresados.

	Mujeres	Hombres	Total
GSE44456	836	726	1562
GSE49376	351	1024	1375
GSE52553	118	133	251
GSE59206	577	166	743

**Tabla 4.8:** Funciones de la ontología GO de componentes celulares expresadas diferencialmente en cada uno de los estudios tras llevar a cabo el enriquecimiento funcional de los resultados obtenidos con la comparación: (MA-MC)-(HA-HC). Los resultados se han ordenado según en cuál de las condiciones comparadas se encuentran sobreexpresados.

	Mujeres	Hombres	Total
GSE44456	310	48	358
GSE49376	195	79	274
GSE52553	15	13	28
GSE59206	159	26	185

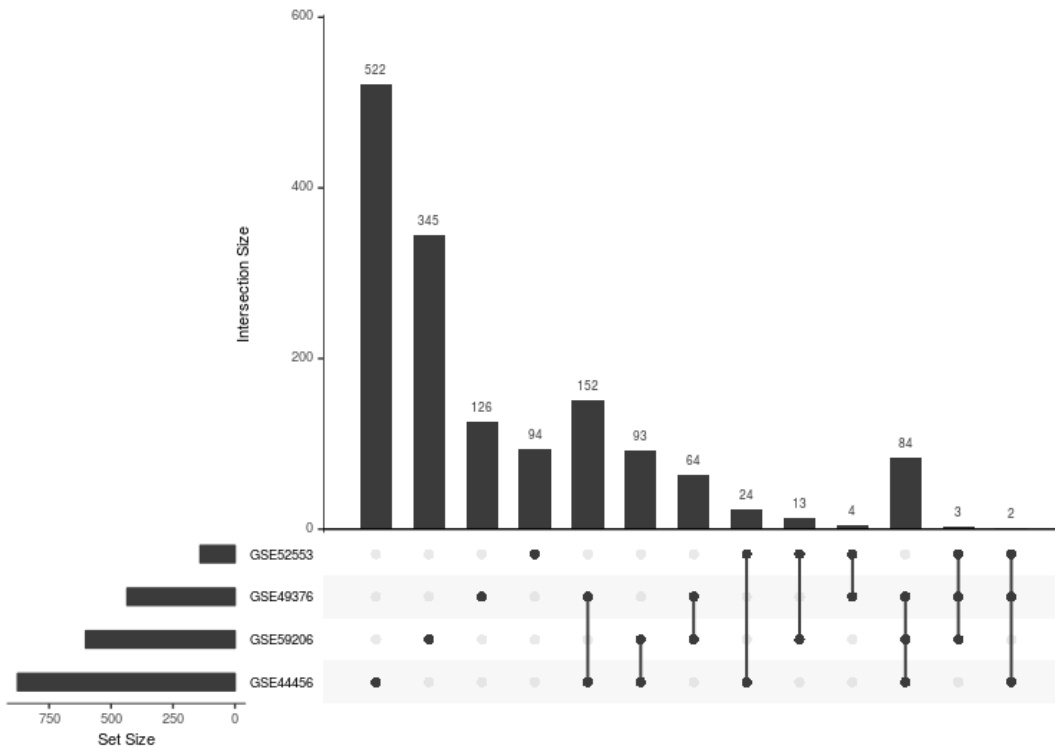
**Tabla 4.9:** Funciones de la ontología GO de funciones moleculares expresadas diferencialmente en cada uno de los estudios tras llevar a cabo el enriquecimiento funcional de los resultados obtenidos con la comparación: (MA-MC)-(HA-HC). Los resultados se han ordenado según en cuál de las condiciones comparadas se encuentran sobreexpresados.

	Mujeres	Hombres	Total
GSE44456	244	153	397
GSE49376	93	143	236
GSE52553	30	40	70
GSE59206	137	94	231

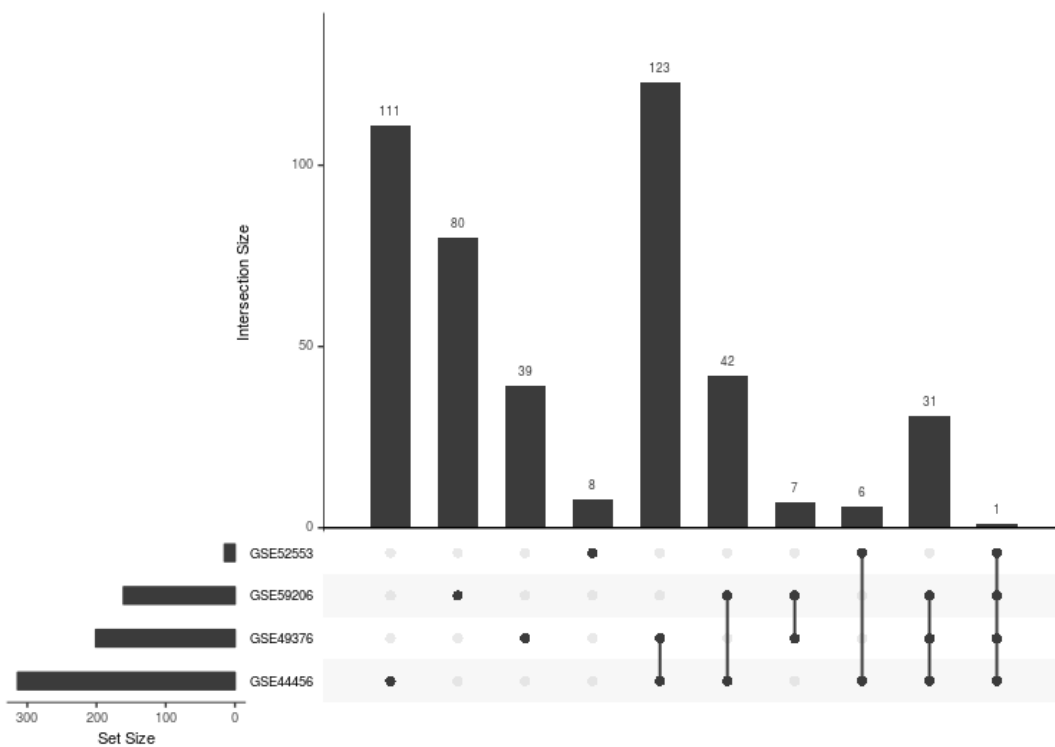
**Tabla 4.10:** Rutas KEGG expresadas diferencialmente en cada uno de los estudios tras llevar a cabo el enriquecimiento funcional de los resultados obtenidos con la comparación: (MA-MC)-(HA-HC). Los resultados se han ordenado según en cuál de las condiciones comparadas se encuentran sobreexpresados.

	Mujeres	Hombres	Total
GSE44456	35	18	53
GSE49376	7	16	23
GSE52553	0	0	0
GSE59206	9	1	10

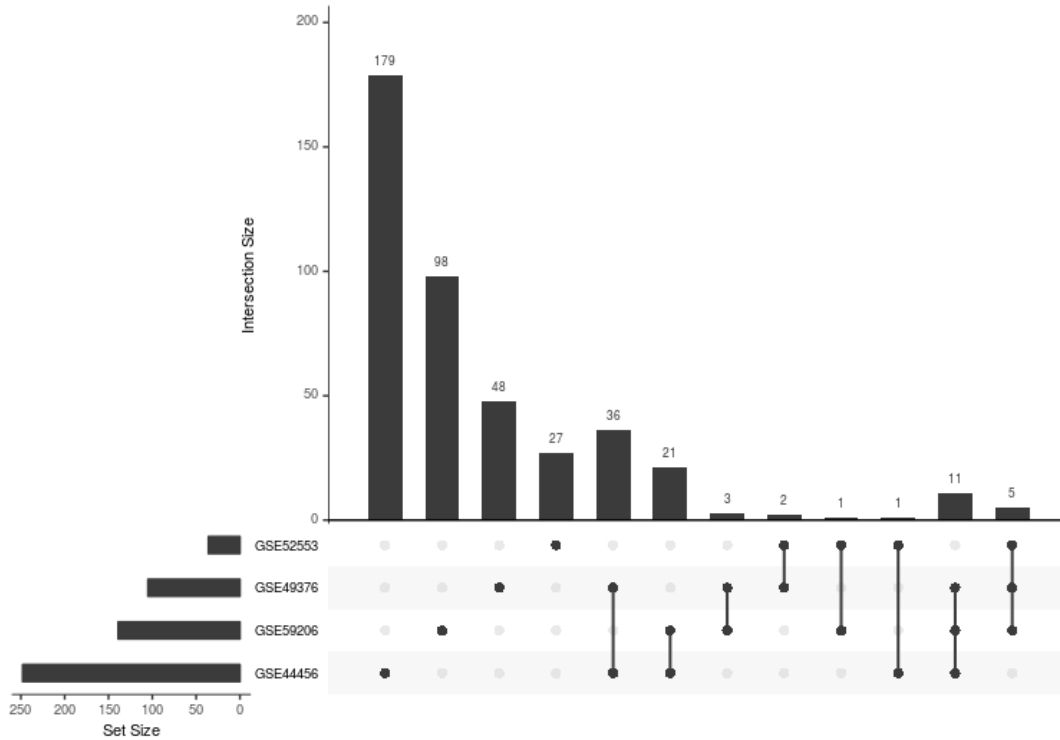
Adicionalmente se ha representado la intersección de dichos términos entre los distintos estudios mediante diagramas UpSet (figuras 4.11-4.18). Dichos diagramas representan, de forma similar a un diagrama de Venn, la cantidad de términos únicos para cada uno de los grupos considerados o para cada una de las intersecciones de los mismos, representando el tamaño de la columna dicha cantidad y los puntos debajo de esta el grupo o intersección a que hace referencia la misma. Solo se encuentran representados los grupos o intersecciones con una cantidad de términos únicos superior a 0.



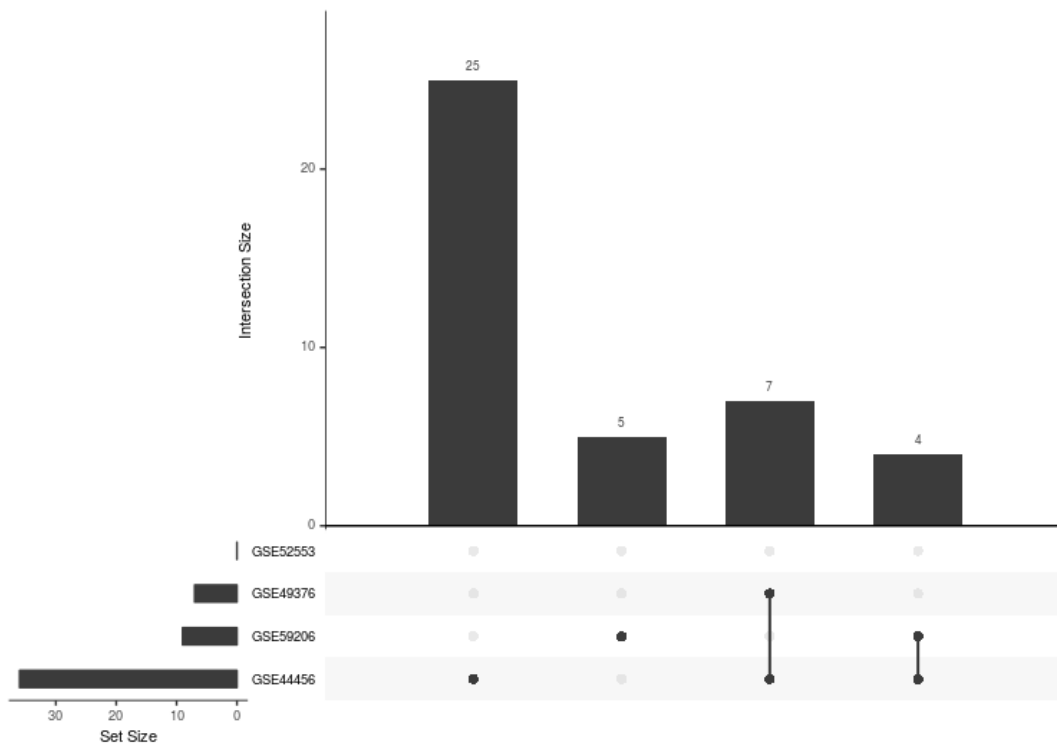
**Figura 4.11:** Diagrama UpSet con los términos GO de Procesos biológicos estadísticamente significativos marcados como UP de cada uno de los estudios analizados, y las intersecciones entre los mismos.



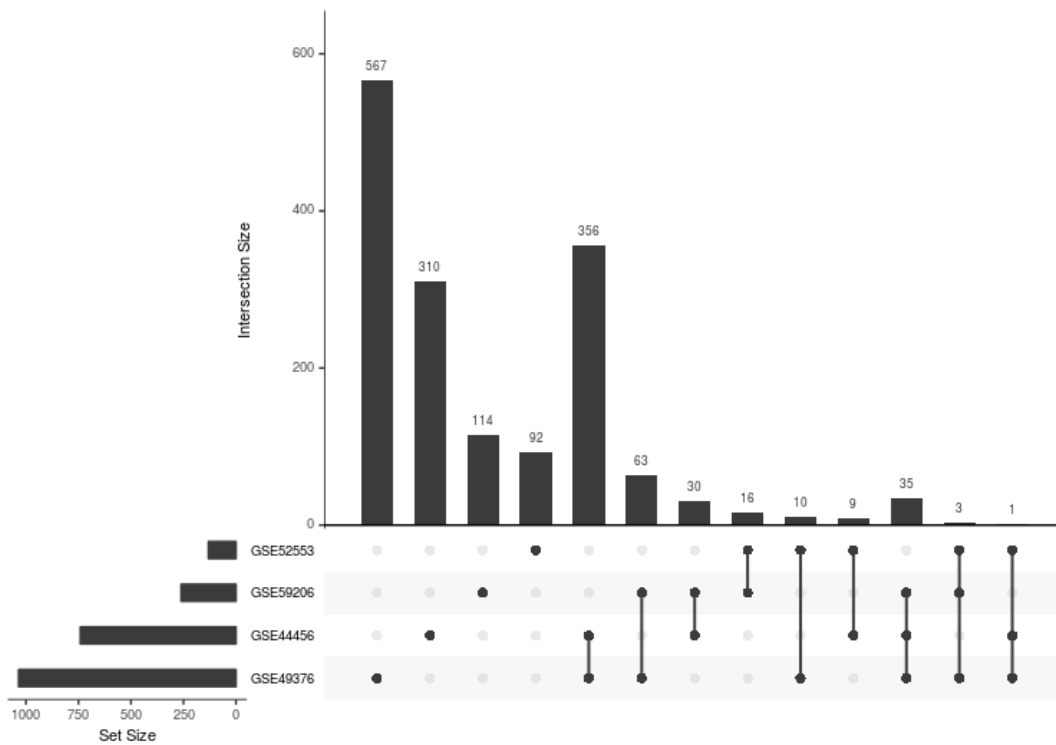
**Figura 4.12:** Diagrama UpSet con los términos GO de Componentes celulares estadísticamente significativos marcados como UP de cada uno de los estudios analizados, y las intersecciones entre los mismos.



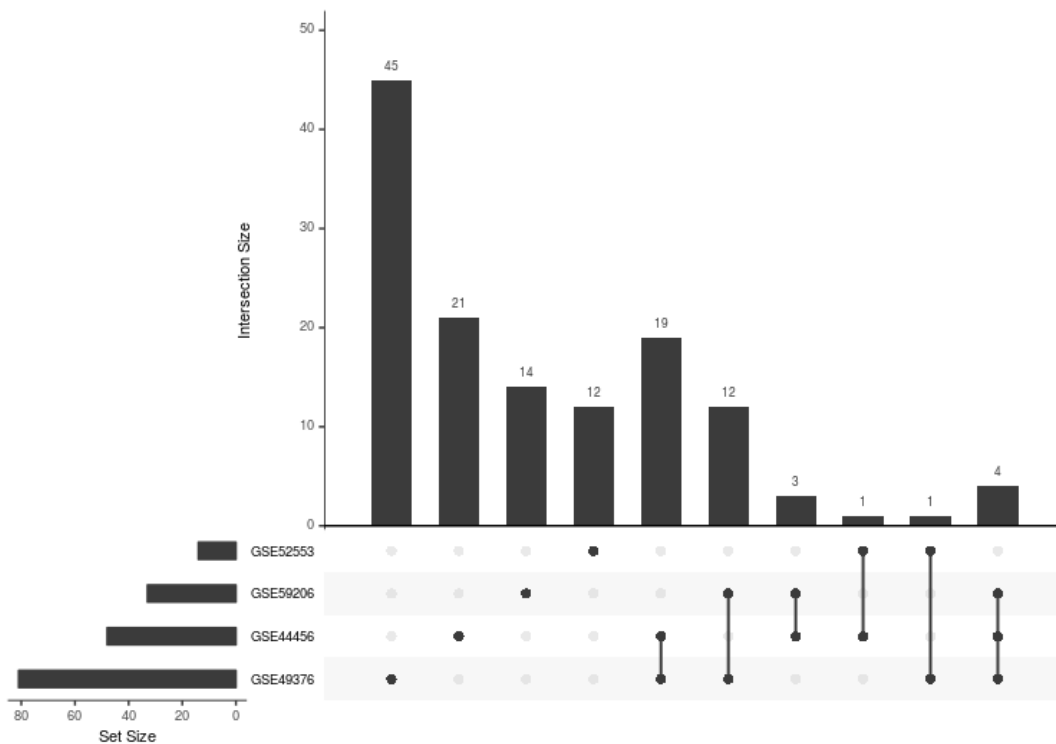
**Figura 4.13:** Diagrama UpSet con los términos GO de Funciones moleculares estadísticamente significativos marcados como UP de cada uno de los estudios analizados, y las intersecciones entre los mismos.



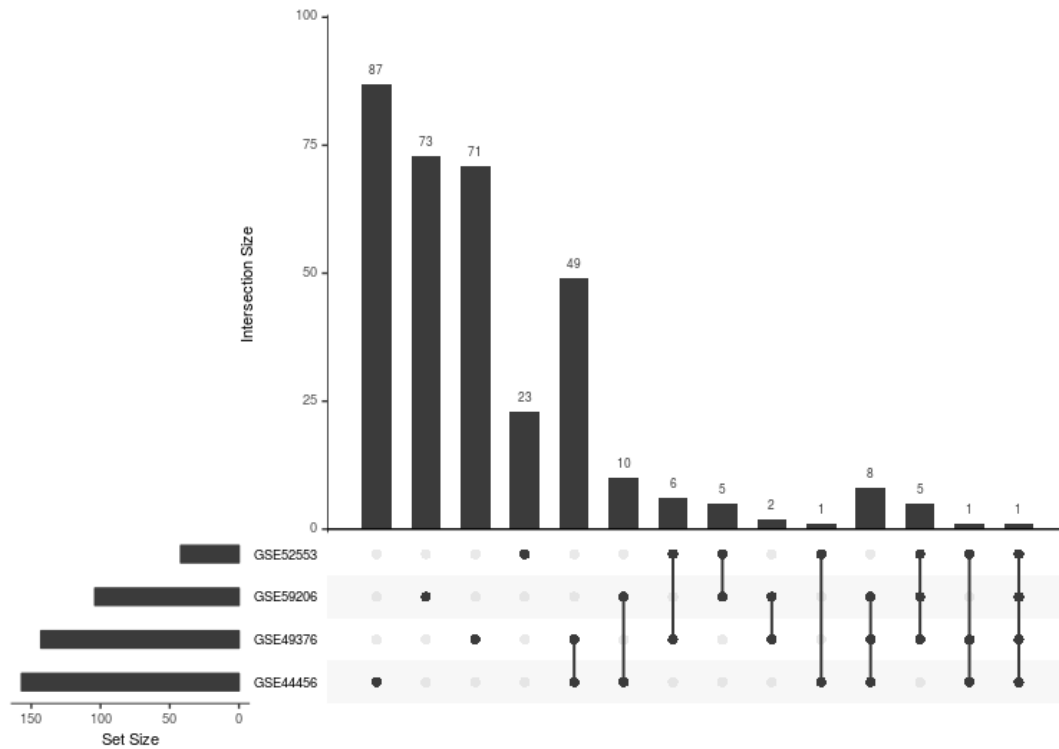
**Figura 4.14:** Diagrama UpSet con las rutas KEGG estadísticamente significativas marcados como UP de cada uno de los estudios analizados, y las intersecciones entre los mismos.



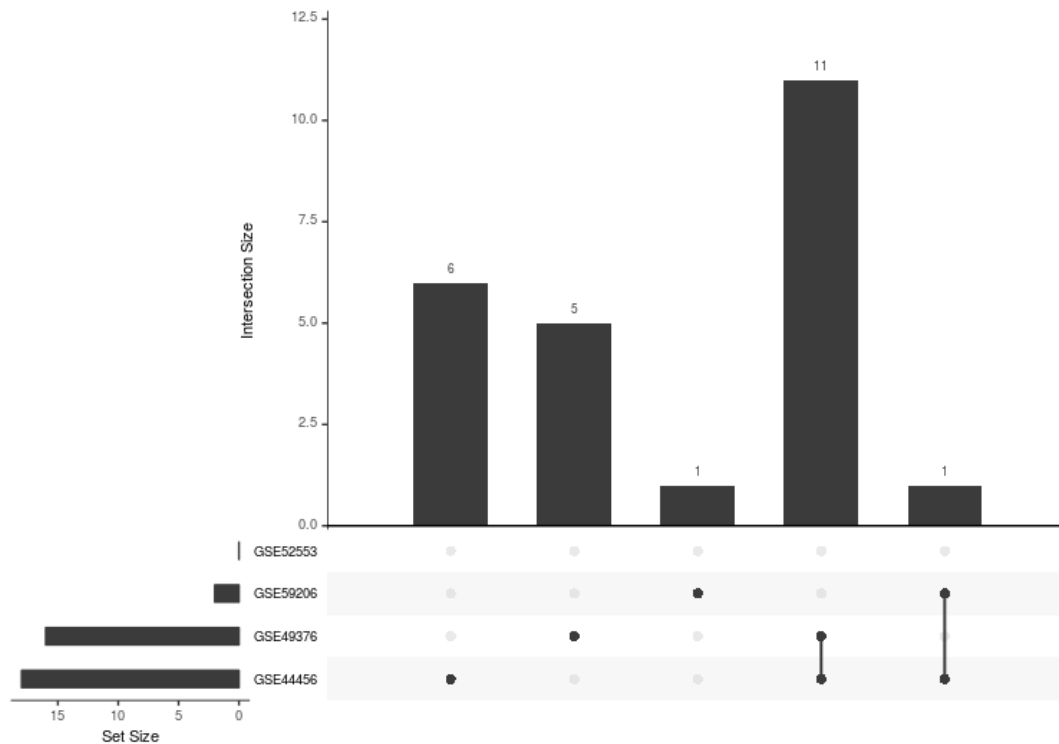
**Figura 4.15:** Diagrama UpSet con los términos GO de Procesos biológicos estadísticamente significativos marcados como DOWN de cada uno de los estudios analizados, y las intersecciones entre los mismos.



**Figura 4.16:** Diagrama UpSet con los términos GO de Componentes celulares estadísticamente significativos marcados como DOWN de cada uno de los estudios analizados, y las intersecciones entre los mismos.



**Figura 4.17:** Diagrama UpSet con los términos GO de Funciones moleculares estadísticamente significativas marcados como DOWN de cada uno de los estudios analizados, y las intersecciones entre los mismos.



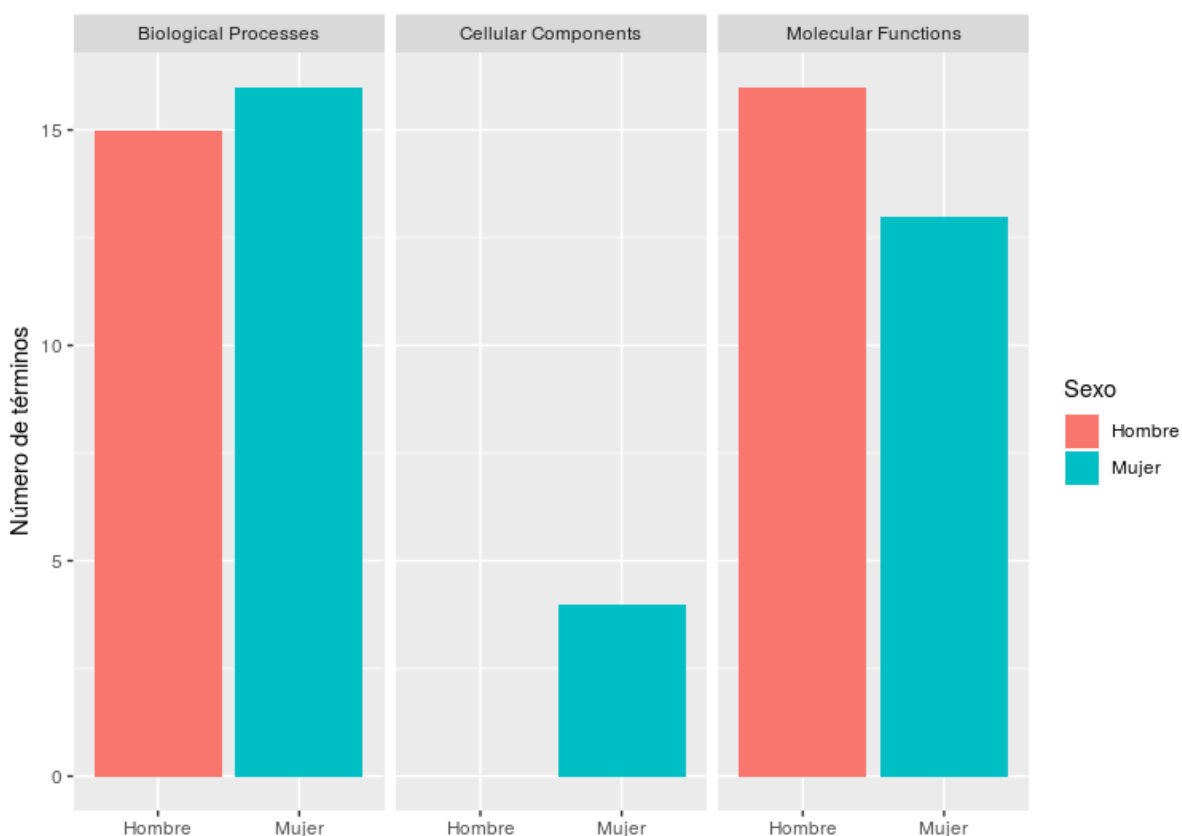
**Figura 4.18:** Diagrama UpSet con las rutas KEGG estadísticamente significativas marcados como DOWN de cada uno de los estudios analizados, y las intersecciones entre los mismos.

#### 4.2.4. Análisis de rutas de señalización

Se llevó a cabo un análisis sobre las rutas de señalización con *Hipathia* sobre cada uno de los estudios seleccionados, basado en la ecuación anteriormente expuesta, que compara todas las condiciones de interés. No obstante, dicho análisis no arrojó ningún resultado estadísticamente significativo (p-valor ajustado por BH menor a 0.05).

### 4.3. Metaanálisis

Se llevaron a cabo los metaanálisis funcionales para cada uno de los términos presentes de cada una de las ontologías GO, y para las rutas KEGG. En el caso de las rutas KEGG los metaanálisis realizados no fueron capaces de mostrar ninguna ruta con resultados estadísticamente significativos. Los resultados obtenidos estuvieron generalmente equilibrados para hombres y mujeres, exceptuando la ontología de Componentes Celulares, donde solo se obtuvieron términos sobrerrepresentados en mujeres.



**Figura 4.19:** Número de funciones estadísticamente significativas para cada una de las ontologías de GO (Procesos biológicos, Componentes celulares y Funciones moleculares), según en qué sexo se encuentran sobrerrepresentados.

#### **4.3.1. Procesos biológicos**

Se obtuvieron un total de 31 términos estadísticamente significativos, 16 sobrerrepresentados en mujeres con SDA y otros 15 en hombres con SDA. En la tabla B.2 del anexo B se listan dichos términos junto con sus estimadores estadísticos del metaanálisis.

Los gráficos de embudo (figuras A.1–A.6 en el anexo A) muestran, para una selección de términos cuyo metaanálisis ha aportado resultados significativos, si los estudios analizados presentan una variabilidad comprendida dentro de una determinada región de confianza. Aunque en algún caso uno de los estudios presenta valores ligeramente desviados respecto del intervalo de confianza, que podría indicar valores más variables en ese estudio concreto para esa función específica, generalmente todos los estudios se encuentran dentro de la región de confianza para todos los términos que han mostrado resultados significativos.

Los gráficos de bosque (figuras A.14-A.19 en el anexo A) muestran, para esa misma selección de términos, una comparación entre el valor de dicho término en cada uno de los estudios analizados y el valor resultante del metaanálisis realizado.

#### **4.3.2. Componentes celulares**

Se obtuvieron un total de 4 términos estadísticamente significativos, todos sobrerrepresentados en mujeres con SDA. En la tabla B.3 del anexo B se listan dichos términos junto con sus estimadores estadísticos del metaanálisis. Así mismo, se ha procedido a seleccionar un grupo de gráficos de embudo (figura A.7. en el anexo A) y bosque (figura A.20 en el anexo A) de entre estos términos.

#### **4.3.3. Funciones moleculares**

Se obtuvieron un total de 29 términos estadísticamente significativos, 13 sobrerrepresentados en mujeres con SDA y otros 16 en hombres con SDA. En la tabla B.4 del anexo B se listan dichos términos junto con sus estimadores estadísticos del metaanálisis. Así mismo, se ha procedido a seleccionar un grupo de gráficos de embudo (figuras A.8-A.13 en el anexo A) y bosque (figuras A.21-A.26 en el anexo A) de entre estos términos.

## 5. Discusión

El SDA presenta una considerable prevalencia en la población mundial, además de ser responsable de un importante número de muertes y gastos médicos todos los años [1]. Dentro de estas estadísticas se observa, además, una marcada diferencia en la incidencia de esta adicción entre hombres y mujeres. Estas diferencias pueden ser explicadas, en parte, por el considerable factor social ligado al consumo de alcohol, tradicionalmente considerado una actividad reservada a los hombres en muchas culturas. No obstante, dichas diferencias entre sexos tienen también una base biológica demostrada, debida al hecho de que el SDA se trata de una enfermedad de origen multifactorial. Sin embargo, y a pesar de que estas diferencias son bien conocidas entre la comunidad médica, el escenario más común en la mayoría de estudios es que suelen presentar una cantidad alarmantemente menor de mujeres, o muestras que provengan de las mismas, respecto de los hombres; llegando en no pocas ocasiones a una total ausencia de las mismas o, simplemente, a la no consideración del sexo como un factor a tener en cuenta a la hora de validar estadísticamente los resultados obtenidos durante el estudio [74]. Así, un paso de gran importancia para el futuro de la investigación biomédica sería la integración de una perspectiva de sexo. Dicha perspectiva favorecería una mejor caracterización de las diferencias entre hombres y mujeres que sufren SDA, además del origen de las mismas. A su vez, se garantizaría una mejor comprensión de los factores de riesgo que afectan a cada sexo y los marcadores que indican el nivel de daño causado por la adicción, además de abrir la posibilidad de adaptar mejor las terapias y tratamientos farmacológicos a seguir para la rehabilitación del paciente [74].

La falta de representación ya comentada queda evidenciada al observar la gran cantidad de estudios potencialmente útiles para este trabajo que fueron descartados debido a que, o bien contenían muestras solamente de hombres, o bien no consideraban el factor sexo en la información de sus muestras. De esta forma, la muestra de estudios disponibles en las bases de datos revisadas que cumpliesen los estándares mínimos para ser incluidos en el metaanálisis quedó drásticamente reducida. Además de esta carencia, también resulta llamativa la falta de estandarización entre distintos estudios; cosa que hizo necesario llevar a cabo todo un proceso de homogeneización con los estudios seleccionados para su evaluación e integración conjunta, y que hubiese sido diferente de haberse usado estudios distintos. Ante esta situación, que se da con mucha frecuencia en el campo de la investigación, expertos de diversas áreas del conocimiento han empezado a proponer los principios *Findable, Accessible, Interoperable, Reusable* (FAIR) [75]. Los beneficios que aportan dichos principios a la hora de garantizar una mejor divulgación del conocimiento científico son tales que su aplicación ya se ha convertido en un requerimiento necesario en ciertos proyectos de gran envergadura, como el programa H2020; garantizando, así, una mejor generación de conocimiento y de datos que puedan ser reutilizados fácilmente [75, 76].

Teniendo en cuenta la escasa cantidad de estudios disponibles que cumpliesen con los requisitos necesarios para su selección, la variable calidad de los trabajos encontrados y la gran heterogeneidad en sus acercamientos, realizar un metaanálisis constituyó la opción más apropiada [54, 65]. Mediante este método se pudieron agrupar resultados de estudios a priori dispares y alcanzar una mayor

robustez de los mismos; consiguiendo, en el proceso, detectar información estadísticamente relevante que no hubiese podido ser vislumbrada mediante una simple intersección o suma de resultados individuales.

A la hora de analizar los términos GO encontrados, entre mujeres destacaría, en primer lugar, la sobreexpresión de términos como GO:0021822 (*negative regulation of cell motility involved in cerebral cortex radial glia guided migration*), directamente relacionado con la inhibición de la migración de neuronas desde la glía radial, aspecto que indicaría una disminución más severa de la regeneración neuronal en este sexo. También relacionado con este aspecto se han encontrado los términos GO:0035724 (*CD24 biosynthetic process*) y GO:2000560 (*positive regulation of CD24 biosynthetic process*), directamente relacionados con un aumento de la síntesis de CD24, una molécula que se expresa en la membrana de los linfocitos B, neutrófilos y neuroblastos. Estos últimos son células que se diferenciarán en neuronas tras migrar desde su punto de origen tras la división de las células de la glía radial. Esto indicaría que, especialmente en mujeres, se observa una disminución en la capacidad de migración de los neuroblastos nacidos de las células de la glía radial, pero que a su vez estos expresan en mayor medida la molécula de membrana CD24. Estas observaciones se contraponen, en cierto modo, a algunos estudios realizados sobre el síndrome alcohólico fetal, donde se observa que las células que expresan CD24 son especialmente sensibles a los efectos del alcohol durante el embarazo, y tanto su población como el nivel en que expresan dicha molécula se ven disminuidos [77]. Esta aparente discrepancia podría indicar, o bien un efecto distinto del alcohol en el cerebro de los fetos respecto del cerebro de una persona adulta, o que llegado el punto en el que el sujeto se ha vuelto adicto a la sustancia, el cerebro desarrolle un mecanismo para compensar los efectos del alcohol, aumentando la expresión de CD24, especialmente entre las mujeres.

Más involucrado con el funcionamiento del sistema nervioso periférico se halla también el término GO:0097156 (*fasciculation of motor neuron axon*), que indicaría una alteración de la organización de los axones de las neuronas motoras. Esto podría estar relacionado con el desarrollo de la enfermedad de Marchiafava-Bignami [78], una enfermedad rara que pueden sufrir las personas con SDA, y cuyos síntomas se centran en una degeneración de la función motora por una necrosis del cuerpo calloso y de las neuronas motoras. Además, se observa que los únicos términos relacionados con la ontología de Componentes Celulares se encuentran también sobreexpresados en mujeres, y están directamente relacionados con la membrana del núcleo denso de las neuronas. Este hecho podría indicar una mayor actividad de dicha región entre mujeres que sufren SDA, de forma similar a lo que se ha visto en las neuronas motoras de *Drosophila melanogaster*, donde se estimula el transporte de vesículas de dicha región [79]. Muy relacionada con estos se encuentra el término GO:0098695 (*inositol 1,4,5-trisphosphate receptor activity involved in regulation of postsynaptic cytosolic calcium levels*), también sobreexpresado en mujeres, y que indicaría una mayor actividad de los receptores postsinápticos de inositol trifosfato. Dichos receptores se hallan en diversos tejidos del organismo, pero uno de los lugares donde se encuentran más presentes es en el cerebelo, y su alteración estaría también relacionada con la degeneración de las funciones motoras ya descrita y un intento del organismo por paliar esta.

Más relacionado con el papel del cerebro en el desarrollo de adicciones se ha encontrado el término GO:2000474 (*regulation of opioid receptor signaling pathway*), que está directamente involucrado con los receptores de opioides en el cerebro. Estas sustancias son neurotransmisores que se han visto estrechamente relacionados con el desarrollo de adicciones [20, 80], y cuyos receptores estarían especialmente alterados entre mujeres que sufren SDA.

Más allá de las alteraciones directamente relacionadas con la función neuronal, en mujeres también se encuentran sobreexpresados términos como GO:0046587 (*positive regulation of calcium-dependent cell-cell adhesion*) y GO:0061833 (*protein localization to tricellular tight junction*). Estos se encuentran directamente relacionados con una mayor síntesis de cadherinas, angulinas y tricelulinas. Estas proteínas son las encargadas de las uniones estrechas entre células, siendo angulinas y tricelulinas responsables de las uniones tricelulares que se dan en algunos tejidos epiteliales. Los efectos del consumo de alcohol parecen incluir una disminución en la presencia o funcionamiento de estas proteínas, causando la disrupción de las uniones que forman en algunos tejidos, y que puede estar implicado en la metástasis del cáncer [81]. Debido a la presencia y función más bien ubicua, especialmente de las cadherinas [82], la interferencia del SDA con las mismas puede relacionarse con un considerable número de problemas de salud en los que el consumo alcohol ha demostrado ser un factor de riesgo, además del cáncer en sí. Así, siguiendo un razonamiento similar al anteriormente expuesto para el caso de CD24, esta aparente discrepancia podría interpretarse como un intento del organismo de las mujeres por compensar el deterioro de dichas uniones, y en ambos casos sería prudente realizar un estudio donde se comparasen las alteraciones en los niveles de expresión de estas proteínas con aquellas sufridas directamente por el tejido expuesto a la sustancia.

También sobreexpresados en mujeres se han hallado otros términos como GO:0048211 (*Golgi vesicle docking*) y GO:0061763 (*multivesicular body-lysosome fusion*), relacionados con funciones que se dan de forma generalizada en tejidos muy distintos. En este caso se vería incrementada la capacidad de las vesículas y cuerpos multivesiculares para fusionarse, formando, entre otras posibilidades, autofagosomas [83]. Se ha visto en ciertos modelos animales que el consumo de alcohol puede favorecer que se dé dicha autofagia, que especialmente en el hígado se llevaría a cabo como mecanismo de defensa para evitar un daño mayor en los tejidos. No obstante, la sobreexposición crónica al alcohol en individuos con SDA causaría que la acción continuada de dicho mecanismo llegara a ser contraproducente en sí misma [84], indicando un mayor deterioro hepático entre mujeres debido al aumento de la autofagia. Relacionado de forma indirecta con dicho deterioro se encuentra también el término GO:0072303 (*positive regulation of glomerular mesangial cell proliferation*), relacionado con la proliferación de células mesangiales, localizadas en los glomérulos de los riñones. En este aspecto, estudios previos han observado una proliferación de estas células en pacientes con enfermedades que causan un considerable deterioro hepático, como es el caso del hígado graso no alcohólico [85]. Esta proliferación, a su vez, puede favorecer el deterioro de la función renal, y la presencia de este término en mujeres con SDA parece fortalecer la relación entre el deterioro hepático y renal, independientemente de la causa del primero.

Por otro lado, y relacionados con las alteraciones del sistema inmunitario, se han encontrado también los términos GO:2000438 (*negative regulation of monocyte extravasation*) y GO:2000570 (*positive regulation of T-helper 2 cell activation*) sobreexpresados en mujeres. En el primer caso se trataría de la inhibición de la extravasación de monocitos a los tejidos periféricos, que implica una inhibición de su transformación en macrófagos, directamente involucrados en la inflamación de los tejidos. Nuevamente, este podría ser un mecanismo del organismo para paliar los efectos, en este caso inflamatorios, del SDA [13, 18]. Por otro lado, en el segundo caso hace referencia a una mayor activación de los linfocitos T CD4 tipo 2, que a su vez favorecen una respuesta inmunitaria humoral, en la que están involucrados los linfocitos B. Durante su maduración estos linfocitos también expresan la proteína CD24, de cuya relación con los neuroblastos se ha hablado previamente. Así, desde una perspectiva inmunitaria, se establece la posibilidad de que el aumento en la expresión de CD24 se pueda deber, no a un intento de paliar los efectos del SDA sobre la regeneración neuronal, sino como resultado del aumento de la actividad de los linfocitos B.

También relacionado con las alteraciones del sistema inmunitario se encontraría el término GO:0045517 (*interleukin-20 receptor binding*). La Interleuquina 20 está relacionada con el proceso de inflamación especialmente en la epidermis, aunque la presencia de otras interleuquinas de su familia en el hígado podría indicar una relación de la misma también con este órgano [86, 87]. Así, la sobreexpresión de esta función indicaría una mayor sensibilidad por parte de las células a la acción de la Interleuquina-20, y, con ello, una mayor tendencia sobre todo en las mujeres a sufrir inflamaciones en la piel.

Se ha visto además una sobreexpresión en mujeres del término GO:0071701 (*regulation of MAPK export from nucleus*), relacionado con las proteínas MAPK. Estas proteínas están involucradas en diversas funciones celulares, entre las que se incluyen la proliferación, apoptosis, inflamación y diferenciación celulares; y cuya alteración podría verse relacionada con un gran número de enfermedades, entre las que se incluiría el cáncer de mama, donde se ha visto que el consumo de alcohol puede ser un factor de riesgo en el desarrollo de metástasis en estos pacientes [28, 88].

Respecto a las funciones moleculares en mujeres destacan una gran cantidad de enzimas que interactúan con las proteínas portadoras de acilo (ACP). Estas proteínas tienen un papel crucial en la biosíntesis de ácidos grasos, cosa que se corresponde con uno de los posibles destinos del etanol consumido tras ser metabolizado, que es la síntesis de ácidos grasos [15]. Así, estos resultados indicarían una mayor síntesis de ácidos grasos a partir de etanol entre las mujeres.

Por otro lado, en cuanto a los términos GO que aparecen sobreexpresados entre hombres que sufren SDA, llama la atención, en primer lugar, una mayor actividad de los términos GO:0021529 (*spinal cord oligodendrocyte cell differentiation*) y GO:0021530 (*spinal cord oligodendrocyte cell fate specification*), centrados en el proceso de diferenciación de los oligodendrocitos de la médula espinal. Normalmente se observa a los oligodendrocitos como unas de las células más afectadas por los efectos perniciosos del SDA [89], Así que nuevamente nos

encontraríamos ante el incremento de un proceso determinado por parte del organismo para paliar los efectos deletéreos del alcohol, y que en este caso apuntaría a una mayor capacidad de reparación de estos daños entre hombres, al menos en la médula espinal.

Igualmente, centrados en el funcionamiento del sistema nervioso, pero relacionados con la función neuronal, se encuentran también los términos GO:0043179 (*rhythmic excitation*) y GO:1901585 (*regulation of acid-sensing ion channel activity*). Estos dos términos apuntarían a una alteración en la capacidad y regularidad de excitación eléctrica de la membrana neuronal, indicando que esta se ve alterada especialmente en hombres. Dichas alteraciones pueden estar relacionadas con una degeneración de las vainas de mielina, que en parte depende de los oligodendrocitos, y causaría importantes disfunciones en la transmisión de las señales eléctricas [90]. Por otro lado, también se encuentran sobreexpresados los términos GO:0004380 (*glycoprotein-fucosylgalactoside alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase activity*) y GO:0004381 (*fucosylgalactoside 3-alpha-galactosyltransferase activity*), directamente involucrados en la síntesis de glicoesfingolípidos, que son cruciales en el sistema nervioso central y están directamente relacionados con el correcto funcionamiento de las neuronas. Así, estos términos indicarían que el organismo de los hombres sufre alteraciones especialmente en el funcionamiento de la membrana neuronal y que al parecer intenta paliar dichas alteraciones especialmente en la médula espinal, como indica el aumento de la expresión de las funciones relacionadas con la diferenciación de oligodendrocitos.

Más relacionados con la función celular en general se hallan los términos GO:0002030 (*inhibitory G protein-coupled receptor phosphorylation*), GO:0031583 (*phospholipase D-activating G protein-coupled receptor signaling pathway*) y GO:0042313 (*protein kinase C deactivation*); estando los dos primeros relacionados con el funcionamiento de la proteína G y el tercero con el de la proteína quinasa C. Estas dos moléculas intervienen en gran cantidad de procesos muy diversos en distintos tipos celulares, indicando una alteración generalizada del funcionamiento celular especialmente severa en hombres, enfocada particularmente a la inhibición del funcionamiento de estas proteínas. Esta idea quedaría respaldada por estudios previos, que han observado una relación entre el alcohol y estas proteínas en distintos tejidos [91, 92].

En cuanto a la relación del SDA con el riesgo aumentado de desarrollar cáncer se ha encontrado en hombres el término GO:1901492 (*positive regulation of lymphangiogenesis*), que favorece la formación de nuevos vasos linfáticos. Este exceso en la formación de dichos vasos puede estar relacionado con el desarrollo de distintas enfermedades, pero posiblemente su relación más característica sea a la hora de favorecer el desarrollo de tumores y la aparición de metástasis [93]. En este mismo sentido se observa también la sobreexpresión en hombres del término GO:2000565 (*negative regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell proliferation*), que implicaría una inhibición de la respuesta inmunitaria de las células T citotóxicas, directamente responsables de exterminar a otras células dañadas, como ocurre con el cáncer, o infectadas por virus. También destaca la presencia del término GO:0070123 (*transforming growth factor beta receptor activity, type III*) que, sumado al resto, y teniendo en cuenta la relación de TGF- $\beta$  con el desarrollo de

algunos tipos de cáncer [94], resultaría en una mayor vulnerabilidad al desarrollo de cáncer y metástasis entre los hombres que sufren SDA.

En contraposición se hallarían los términos GO:0052894 (*norspermine:oxygen oxidoreductase activity*) y GO:0052895 (*N1-acetylspermine:oxygen oxidoreductase (N1-acetylspermidine-forming) activity*), que indicarían un aumento de la síntesis de espermidina, una poliamina que ha demostrado ser un factor protector frente al cáncer, además de evitar el envejecimiento del tejido cardiovascular y nervioso, entre otros [95]. Esta sobreexpresión de una sustancia tan involucrada en la correcta conservación del organismo sería, posiblemente, una de las formas más eficaces en que el organismo de los hombres intenta paliar los efectos negativos del SDA.

Resulta llamativa entre los hombres, también, la presencia de GO:0120158 (*positive regulation of collagen catabolic process*), que implicaría una mayor degradación del colágeno y, por tanto, una mayor dificultad por parte de numerosos tejidos para mantener su estructura.

También se observa la presencia de los términos GO:1901999 (*homogentisate metabolic process*), GO:1902000 (*homogentisate catabolic process*) y GO:0004334 (*fumarylacetoacetase activity*), que indicarían un aumento de la degradación de ácido homogentísico en hombres, en el que está involucrada la fumarilacetoacetasa. En estudios previos se ha observado la capacidad de esta sustancia para proteger el hígado del daño oxidativo que puede causar el etanol [96]; cosa que apuntaría a una capacidad disminuida entre los hombres para proteger el hígado del daño oxidativo causado por el SDA. A su vez, se han encontrado también numerosos términos GO de funciones moleculares involucradas en el metabolismo de distintos aminoácidos; implicando un aumento del metabolismo de estas moléculas en hombres, que se corresponde con alteraciones previamente descritas que puede causar el consumo de alcohol [97]. También en el mismo sentido se hallaría el término GO:1905802 (*regulation of cellular response to manganese ion*), que podría indicar una mayor sensibilidad al manganeso, cuya interacción con el consumo de alcohol ha demostrado potenciar el daño hepático que este último puede causar [98]. En conjunto, estos términos apuntarían a una degeneración bastante severa de la función hepática entre hombres. No obstante, el manganeso es un oligoelemento de gran importancia para gran cantidad de procesos biológicos muy distintos, así que cabría esperar una mayor alteración de estos también entre hombres.

También se ve incrementada la actividad de GO:0018549 (*methanethiol oxidase activity*), capaz de metabolizar el metanetiol, una sustancia cuya concentración se ve incrementada en personas que toman alcohol con regularidad, y que entre otras cosas es causante de un característico mal aliento [99]. Nuevamente, cabría suponer que el organismo aumenta la actividad de esta enzima con el objetivo de paliar los efectos perniciosos de la acumulación del metanetiol debida al SDA.

Finalmente, otra función sobreexpresada en hombres ha sido GO:0031707 (*endothelin A receptor binding*), que favorece la unión entre la endotelina A y su receptor, que a su vez promueve la vasoconstricción y, con ello, el aumento de la

presión sanguínea. En estudios previos ya se ha visto una relación entre el alcohol y esta molécula [100], y por tanto indicaría un mayor aumento de la presión sanguínea entre los hombres que sufren SDA.

## 6. Conclusiones

1. El metaanálisis es un método robusto y eficaz para evaluar e integrar datos provenientes de estudios ómicos con enfoques muy heterogéneos. Su aplicación potencia el uso de datos FAIR en las investigaciones biomédicas.
2. En mujeres se han detectado alteraciones asociadas con la migración de neuroblastos, el funcionamiento de las neuronas motoras, los receptores de opioides, la integridad de las uniones estrechas, el mecanismo de autofagia, la respuesta inmunitaria humoral y la formación de ácidos grasos.
3. En hombres se han detectado alteraciones asociadas con la formación de oligodendrocitos en la médula espinal, la integridad y funcionalidad de la membrana neuronal, la transducción de señales, la formación de vasos linfáticos, la respuesta inmunitaria celular, la síntesis de espermidina, la destrucción de colágeno, la protección del hígado frente al estrés oxidativo y el metabolismo de aminoácidos.
4. La estrategia seguida en este estudio permite la detección y caracterización de diferencias debidas al sexo en las alteraciones causadas por el SDA mediante abordajes ómicos con un enfoque estadístico robusto, incorporando una perspectiva necesaria para el desarrollo de la medicina personalizada en el futuro de la biomedicina.

## Bibliografía

- 1: World Health Organization. Global status report on alcohol and health - 2014, 2014 edition. 2014. ISBN: 9789240692763
- 2: Witt, ED. Puberty, hormones, and sex differences in alcohol abuse and dependence. *Neurotoxicology and Teratology*. 2007 Jan-Feb;29(1):81-95
- 3: World Health Organization. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th revision. Volume 2. 2010. ISBN: 9789241548342
- 4: American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition. 2013. ISBN: 9780890425541
- 5: Dudley, R. Fermenting fruit and the historical ecology of ethanol ingestion: is alcoholism in modern humans an evolutionary hangover? *Addiction*. 2002 Apr;97(4):381-8.
- 6: McGovern, PE. *Uncorking the Past: The Quest for Wine, Beer, and Other Alcoholic Beverages*. 2009. ISBN: 9780520267985.
- 7: McGovern, PE. et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 21;101(51):17593-8
- 8: Oscar-Berman, M. and Marinković, K. Alcohol: effects on neurobehavioral functions and the brain. *Neuropsychol Rev*. 2007 Sep;17(3):239-57.
- 9: Mooney, SM. and Miller, MW. Time-specific effects of ethanol exposure on cranial nerve nuclei: gastrulation and neuronogenesis. *Exp Neurol*. 2007 May;205(1):56-63.
- 10: Enoch, MA. Pharmacogenomics of alcohol response and addiction. *Am J Pharmacogenomics*. 2003;3(4):217-32.
- 11: Arias, AJ. and Kranzler, HR. Treatment of Co-Occurring Alcohol and Other Drug Use Disorders. *Alcohol Res Health*. 2008; 31(2): 155–167.
- 12: Deitrich, R., Zimatkin, S. and Pronko, S. Oxidation of Ethanol in the Brain and Its Consequences. *Alcohol Res Health*. 2006; 29(4): 266–273.
- 13: Romanazzi, V., Schilirò, T., Carraro, E. and Gilli, G. Immune response to acetaldehyde-human serum albumin adduct among healthy subjects related to alcohol intake. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2013; 36(2): 378-383.
- 14: Guerri, C. and Pascual, M. Reproductive and developmental toxicology. Second Edition. Chapter 24: Effects of Alcohol on Embryo/Fetal Development. 2011. ISBN: 9780123820327.

- 15: Ghazali, R. and Patel, VB. Molecular aspects of alcohol and nutrition. Chapter 2: Alcohol metabolism: General aspects. 2016. ISBN: 9780128007730.
- 16: Louvet, A. and Mathurin, P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 Apr;12(4):231-42.
- 17: Hipólito, L., Sánchez, MJ., Polache, A. and Granero, L. Brain metabolism of ethanol and alcoholism: an update. *Curr Drug Metab*. 2007 Oct;8(7):716-27.
- 18: Petrasek, J. et al. Metabolic danger signals, uric acid and ATP, mediate inflammatory cross-talk between hepatocytes and immune cells in alcoholic liver disease. *J Leukoc Biol*. 2015 Aug;98(2):249-56.
- 19: Costardi, JV. et al. A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2015 Aug;61(4):381-7.
- 20: Koob, GF. et al. Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998 Feb;22(1):3-9.
- 21: Pascual, M., Baliño, P., Alfonso-Loeches, S., Aragón, CM. and Guerri, C. Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain Behav Immun*. 2011 Jun;25 Suppl 1:S80-91.
- 22: Enoch, MA. Genetic and environmental influences on the development of alcoholism: resilience vs. risk. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Dec;1094:193-201.
- 23: Wilnsack, SC., Vogeltanz, ND., Klassen, AD. and Harris, TR. Childhood sexual abuse and women's substance abuse: national survey findings. *J Stud Alcohol*. 1997 May;58(3):264-71.
- 24: De Bellis, MD. et al. Hippocampal volume in adolescent-onset alcohol use disorders. *Am J Psychiatry*. 2000 May;157(5):737-44.
- 25: Hillerstormhöfel S. and Swartzwelder, S. Alcohol's Effects on the Adolescent Brain What Can Be Learned From Animal Models. *Alcohol Research and Health*. 2005; 28(4): 213-21.
- 26: Enoch, MA. Genetics, stress and the risk for addiction. In *Stress and Addiction: Biological and Psychological Mechanisms*. 2007. ISBN: 9780123706324.
- 27: Neumark, YD., Friedlander, Y., Thomasson, HR. and Li, TK. Association of the ADH2\*2 allele with reduced ethanol consumption in Jewish men in Israel: a pilot study. *J Stud Alcohol*. 1998 Mar;59(2):133-9.
- 28: Garfinkel, L., Boffetta, P. and Stellman, SD. Alcohol and breast cancer: a cohort study. *Prev Med* 1988;17:686-93.
- 29: Prescott, CA., Aggen, SH. and Kendler, KS. Sex differences in the sources of genetic liability to alcohol abuse and dependence in a population-based sample of U.S. twins. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999 Jul;23(7):1136-44.

- 30: Mason, BJ. and Heyser, CJ. The neurobiology, clinical efficacy and safety of acamprostate in the treatment of alcohol dependence. *Expert Opin Drug Saf.* 2010 Jan;9(1):177-88.
- 31: Heilig, M., Egli, M., Crabbe, JC. and Becker, HC. Acute withdrawal, protracted abstinence and negative affect in alcoholism: are they linked? *Addict Biol.* 2010 Apr;15(2):169-84.
- 32: Gabbard, G. Treatments of psychiatric disorders, Volumen 1. American Psychiatric Press, 2001. ISBN: 0880489103.
- 33: Vaillant, GE. A 60-year follow-up of alcoholic men. *Addiction.* 2003 Aug;98(8):1043-51.
- 34: Watson, JD. and Crick, FHC. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature.* 1953; 171: 737-738.
- 35: Alberts, B. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science. 2008. ISBN: 0815332181
- 36: Nelson, D., Cox, M. and Lehninger, A. Lehninger Principles of biochemistry. 2017. ISBN: 9781319108243.
- 37: Yadav, SP. The wholeness in suffix -omics, -omes, and the word om. *J Biomol Tech.* 2007 Dec;18(5):277.
- 38: Manzoni, C. et al. Genome, transcriptome and proteome: The rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Brief Bioinform.* 2018 Mar 1;19(2):286-302.
- 39: Taub, FE., DeLeo, JM. and Thompson, EB. Sequential comparative hybridizations analyzed by computerized image processing can identify and quantitate regulated RNAs. *DNA.* 1983;2(4):309-27.
- 40: Doménech-Sáncheza, A. and Vilab, J. Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en la microbiología médica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2004; 22: 46-54.
- 41: Schena, M. Genome analysis with gene expression microarrays. *BioEssays.* 1996; 18: 427-431
- 42: Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009 Jan;10(1):57-63.
- 43: Conesa, A. et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology.* 2016; 17: 13.

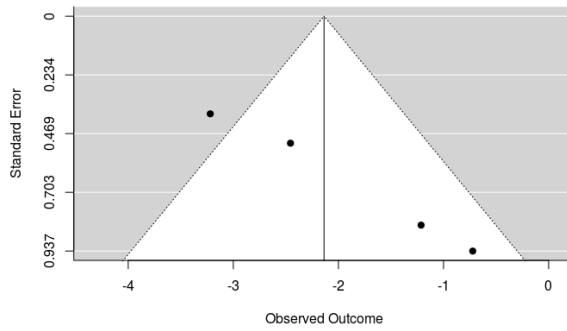
- 44: García-García, F. Methods of functional enrichment analysis in genomic studies. Ph.D. thesis. 2016.
- 45: Ashburner et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet.* May 2000;25(1):25-9
- 46: The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* Jan 2019;47(D1):D330-D338.
- 47: Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., Morishima, K., and Tanabe, M.; New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47: D590-D595.
- 48: Kanehisa, Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K.; KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45: D353-D361.
- 49: Kanehisa, M. and Goto, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: 27-30.
- 50: Subramanian, A. et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2005; 102: 15545–15550.
- 51: Hidalgo, MR. et al. High throughput estimation of functional cell activities reveals disease mechanisms and predicts relevant clinical outcomes. *Oncotarget.* 2017; 8: 5160-5178.
- 52: Glass, GV. Primary, Secondary, and Meta-Analysis of Research. *Educational Researcher.* 1976; 5: 3-8.
- 53: Normand, SLT. Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting. *Statistics in Medicine.* 1999; 18: 248-287.
- 54: Liberati, A. et al. The prisma statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: Explanation and elaboration. *PLOS Medicine.* 2009; 6: 1-28.
- 55: R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2019.
- 56: Barrett, T. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Research.* 2012; 41: D991-D995.
- 57: Kolesnikov, N. et al. ArrayExpress update—simplifying data submissions. *Nucleic acids research.* 2015; 43: D1113-D1116.
- 58: Davis, S. and Meltzer, P. GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics.* 2007; 14: 1846-1847.

- 59: Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, KD. and Tatusova, T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic acids research*. 2010; 39: D52-D57.
- 60: Benjamini, Y. and Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. 1995; 57: 289-300.
- 61: Montaner, D. and Dopazo, J. Multidimensional gene set analysis of genomic data. *PLOS ONE*. 2010; 5: 1–13.
- 62: Durinck, S., Spellman, PT., Birney, E. and Huber, W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the *r/bioconductor* package biomart. *Nature Protocols*. 2009; 4: 1184–1191.
- 63: Higgins, J. and Green, S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*, vol. 2011. 2011.
- 64: Viechtbauer, W. Conducting Meta-Analyses in R with the metafor Package. *Journal of Statistical Software*. 2010; 36: 1–48.
- 65: DerSimonian, R. and Laird, N. Meta-analysis in clinical trials. *Controlled Clinical Trials*. 1986; 7: 177–188.
- 66: Hedges, LV., Gurevitch, J. and Curtis, PS. The Meta-Analysis of Response Ratios in Experimental Ecology. *Ecology*. 1999; 80: 1150–1156.
- 67: Schmidt, FL. and Hunter, JE. *Methods of Meta-Analysis: Correcting Error and Bias in Research Findings*. SAGE Publications. 2015.
- 68: Sidik, K. and Jonkman, JN. A note on variance estimation in random effects meta-regression. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*. 2005; 15: 823–838.
- 69: Raudenbush, SW. and Bryk, AS. Empirical Bayes meta-analysis. *Journal of Educational Statistics*. 1985; 10: 75–98.
- 70: McClintick, J. et al. Stress-response pathways are altered in the hippocampus of chronic alcoholics. *Alcohol*. 2013; 47(7): 505-515.
- 71: Xu, H. et al. Sex-biased methylome and transcriptome in human prefrontal cortex. *Human Molecular Genetics*. 2014; 23(5): 1260-1270.
- 72: McClintick, J. et al. Ethanol treatment of lymphoblastoid cell lines from alcoholics and non-alcoholics causes many subtle changes in gene expression. *Alcohol*. 2014; 48(6): 603-610.
- 73: Beech, R. et al. Stress-related alcohol consumption in heavy drinkers correlates with expression of miR-10a, miR-21, and components of the TAR-RNA-binding protein-associated complex. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2014; 38(11): 2743-2753.

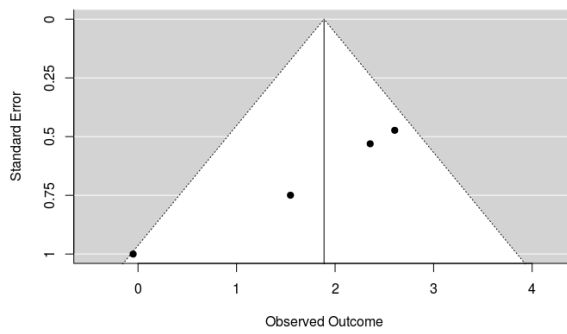
- 74: Kim, AM., Tingen, CM. and Woodruff, TK. Sex bias in trials and treatment must end. *Nature*. 2010 Jun 10;465(7299): 688-9.
- 75: Wilkinson, MD. et al. The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Sci Data*. 2016 Mar 15;3: 160018.
- 76: European Commission. Guidelines on FAIR Data Management in Horizon 2020. Tech. Rep. 2016.
- 77: Tingling, JD. et al. CD24 expression identifies teratogen-sensitive fetal neural stem cell subpopulations: evidence from developmental ethanol exposure and orthotopic cell transfer models. *PLoS One*. 2013 Jul 22;8(7): e69560.
- 78: Hoshino, Y. et al. Marchiafava-Bignami disease mimics motor neuron disease: case report. *BMC Neurol*. 2013 Dec 21;13: 208.
- 79: Iacobucci, GJ. and Gunawardena, S. Ethanol stimulates the in vivo axonal movement of neuropeptide dense-core vesicles in *Drosophila* motor neurons. *J Neurochem*. 2018 Feb;144(4): 466-482.
- 80: Hyytiä, P. Involvement of mu-opioid receptors in alcohol drinking by alcohol-preferring AA rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993 Jul;45(3): 697-701.
- 81: Xu, M. Ethanol disrupts vascular endothelial barrier: implication in cancer metastasis. *Toxicol Sci*. 2012 May;127(1): 42-53.
- 82: Hirano, S., Nose, A., Hatta, K., Kawakami, A. and Takeichi, M. Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J Cell Biol*. 1987 Dec;105(6 Pt 1): 2501-10.
- 83: Metcalf, D. and Isaacs, AM. The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes. *Biochem Soc Trans*. 2010 Dec;38(6): 1469-73.
- 84: Potz, BA., Lawandy, IJ., Clements, RT. and Sellke, FW. Alcohol modulates autophagy and apoptosis in pig liver tissue. *J Surg Res*. 2016 Jun 1;203(1): 154-62.
- 85: Alhasson, F. NKT cell modulates NAFLD potentiation of metabolic oxidative stress-induced mesangial cell activation and proximal tubular toxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016 Jan 1;310(1): F85-F101.
- 86: Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* (2011) 29: 71–109.
- 87: Caparrós, E. and Francés, R. The Interleukin-20 Cytokine Family in Liver Disease. *Front Immunol*. 2018 May 28;9: 1155.

- 88: Zhao, M. et al. Alcohol promotes migration and invasion of triple-negative breast cancer cells through activation of p38 MAPK and JNK. *Mol Carcinog.* 2017 Mar;56(3): 849-862.
- 89: de la Monte, SM. and Kril, JJ. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol.* 2014 Jan;127(1): 71-90.
- 90: Pfefferbaum, A., Rosenbloom, M., Rohlfing, T. and Sullivan, EV. Degradation of association and projection white matter systems in alcoholism detected with quantitative fiber tracking. *Biol Psychiatry.* 2009; 65: 680–90.
- 91: Glaaser, IW. and Slesinger, PA. Dual activation of neuronal G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels by cholesterol and alcohol. *Sci Rep.* 2017 Jul 4;7(1): 4592.
- 92: Cozzoli, DK. et al. Protein Kinase C Epsilon Activity in the Nucleus Accumbens and Central Nucleus of the Amygdala Mediates Binge Alcohol Consumption. *Biol Psychiatry.* 2016 Mar 15;79(6): 443-51.
- 93: Stacker, SA. et al. Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2014 Mar;14(3): 159-72.
- 94: Jung, B., Staudacher, JJ. and Beauchamp, D. Transforming Growth Factor  $\beta$  Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2017 Jan;152(1): 36-52.
- 95: Madeo, F., Eisenberg, T., Pietrocola, F. and Kroemer, G. Spermidine in health and disease. *Science.* 2018 Jan 26;359(6374). pii: eaan2788.
- 96: Medina, ME., Galano, A. and Trigos Á. Scavenging Ability of Homogentisic Acid and Ergosterol toward Free Radicals Derived from Ethanol Consumption. *J Phys Chem B.* 2018 Aug 2;122(30): 7514-7521.
- 97: Shaw, S. Alcohol induced changes of amino acid metabolism. *Leber Magen Darm.* 1978 Oct;8(5): 265-70.
- 98: Deng, Q. et al. Interaction of occupational manganese exposure and alcohol drinking aggravates the increase of liver enzyme concentrations from a cross-sectional study in China. *Environ Health.* 2013 Apr 15;12: 30.
- 99: McClain, CJ., Zieve, L., Doizaki, WM., Gilberstadt, S. and Onstad, GR. Blood methanethiol in alcoholic liver disease with and without hepatic encephalopathy. *Gut.* 1980 Apr;21(4): 318-23.
- 100: Gonçalves, FZ. et al. Expression profile of endothelin receptors (ETA and ETB) and microRNAs-155 and -199 in the corpus cavernosum of rats submitted to chronic alcoholism and diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res.* 2018 Mar 1;51(3): e6329.

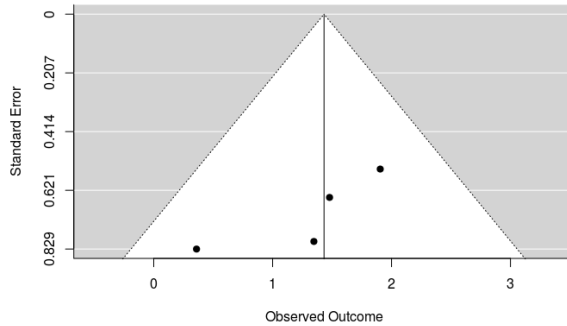
## Anexo A - Figuras



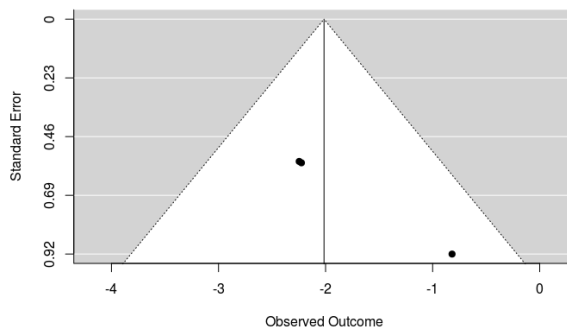
**Figura A.1:** Gráfico de embudo para el término GO:0002030.



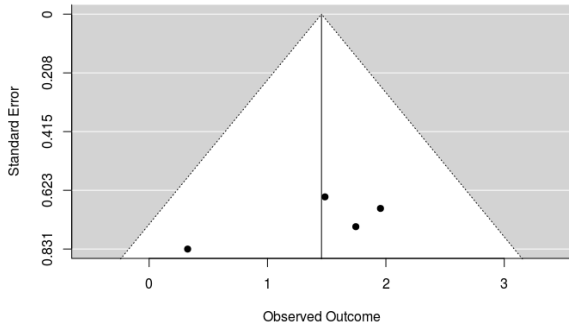
**Figura A.2:** Gráfico de embudo para el término GO:0035724.



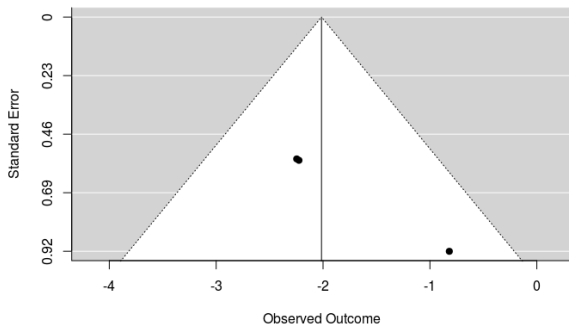
**Figura A.3:** Gráfico de embudo para el término GO:0061763.



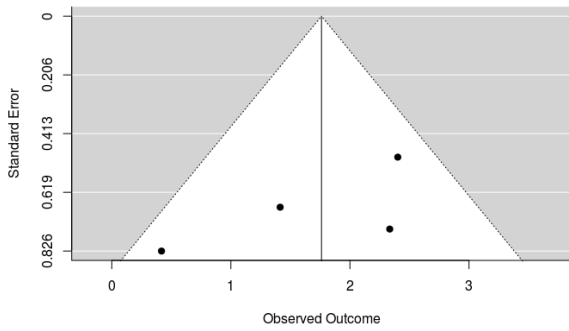
**Figura A.4:** Gráfico de embudo para el término GO:1901492.



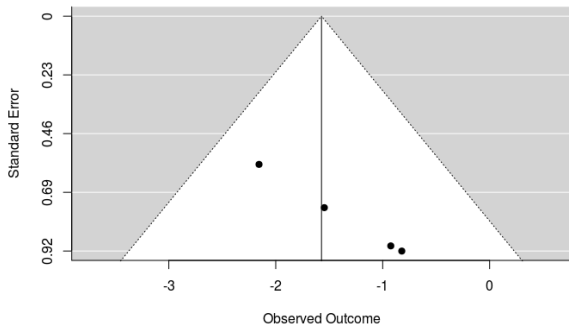
**Figura A.5:** Gráfico de embudo para el término GO:2000474.



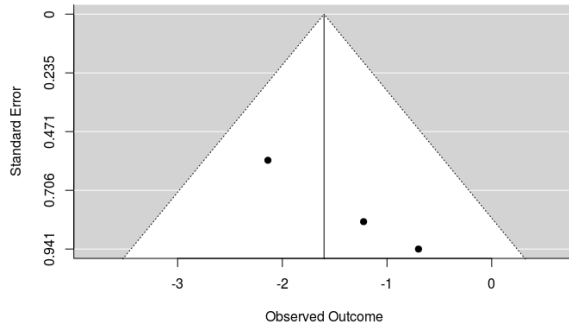
**Figura A.6:** Gráfico de embudo para el término GO:2000565.



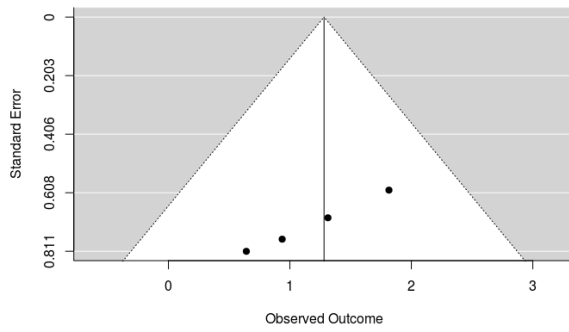
**Figura A.7:** Gráfico de embudo para el término GO:0098675.



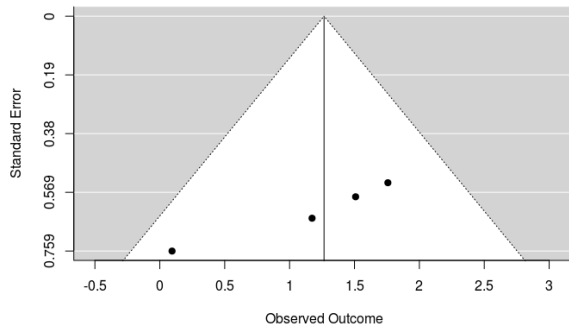
**Figura A.8:** Gráfico de embudo para el término GO:0003882.



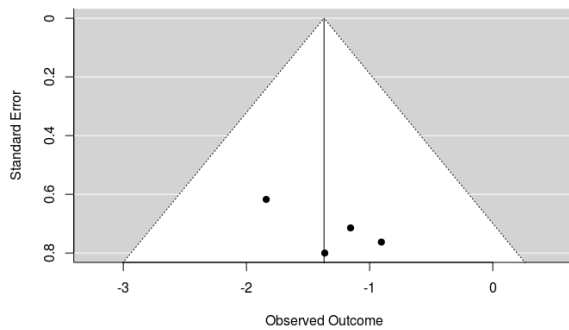
**Figura A.9:** Gráfico de embudo para el término GO:0004380.



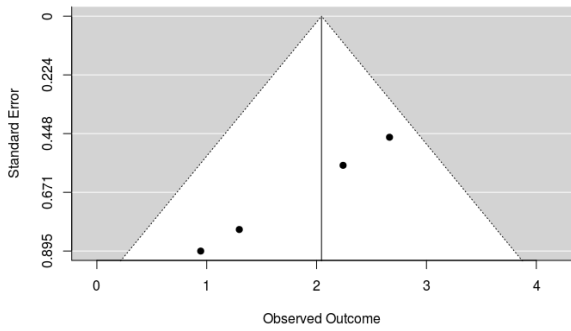
**Figura A.10:** Gráfico de embudo para el término GO:0016418.



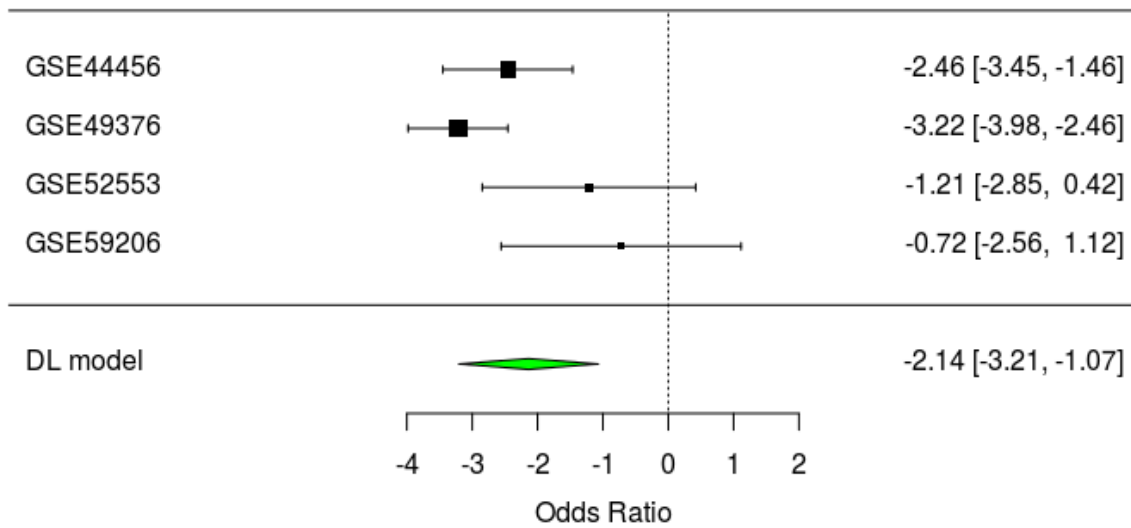
**Figura A.11:** Gráfico de embudo para el término GO:0031997.



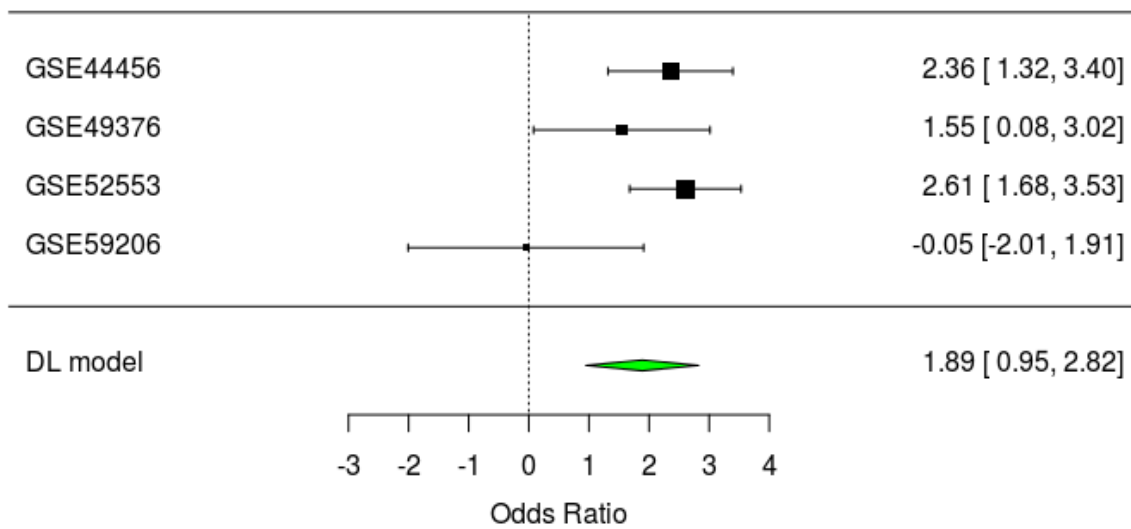
**Figura A.12:** Gráfico de embudo para el término GO:0047635.



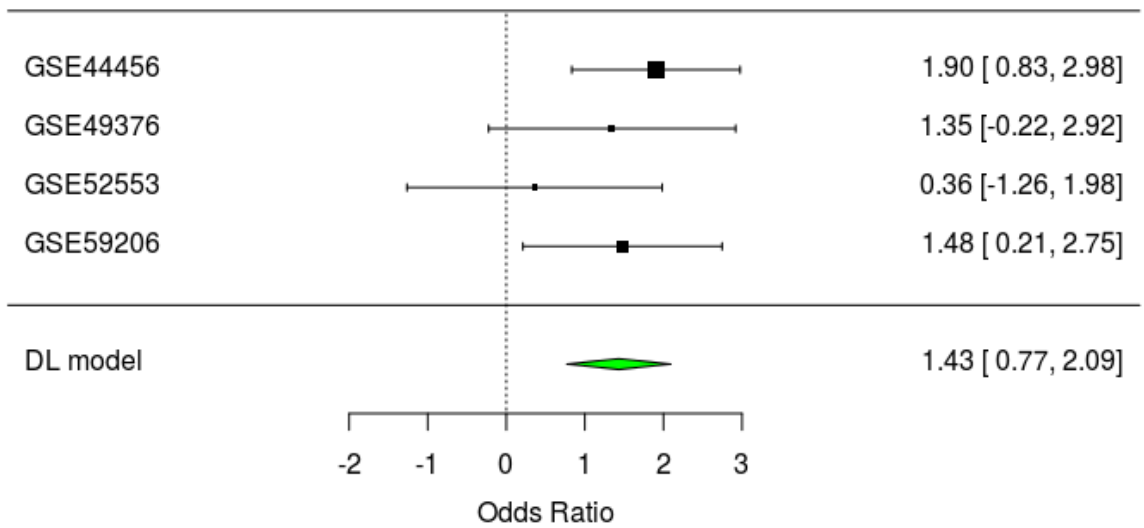
**Figura A.13:** Gráfico de embudo para el término GO:0102131.



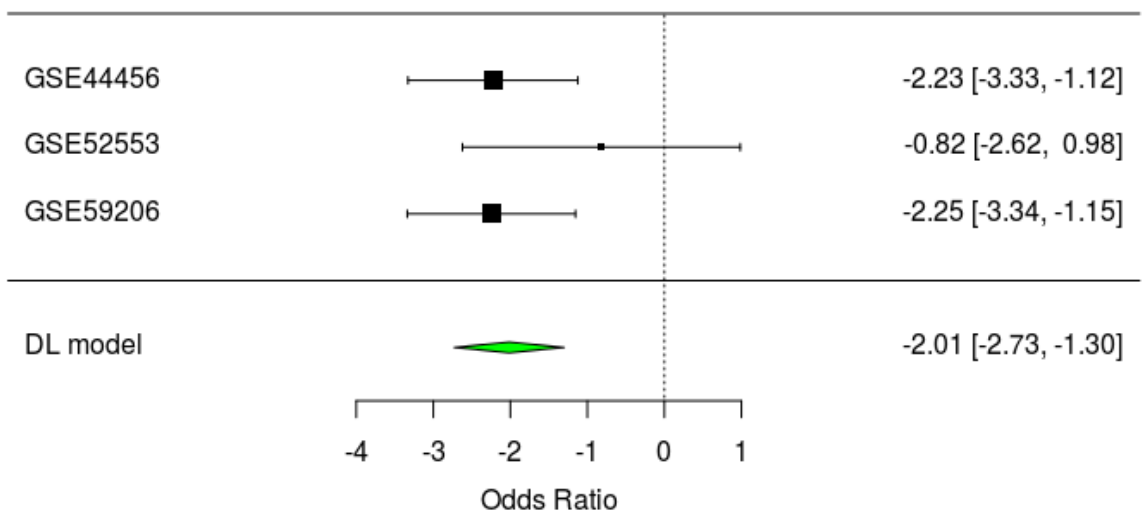
**Figura A.14:** Gráfico de bosque para el término GO:0002030.



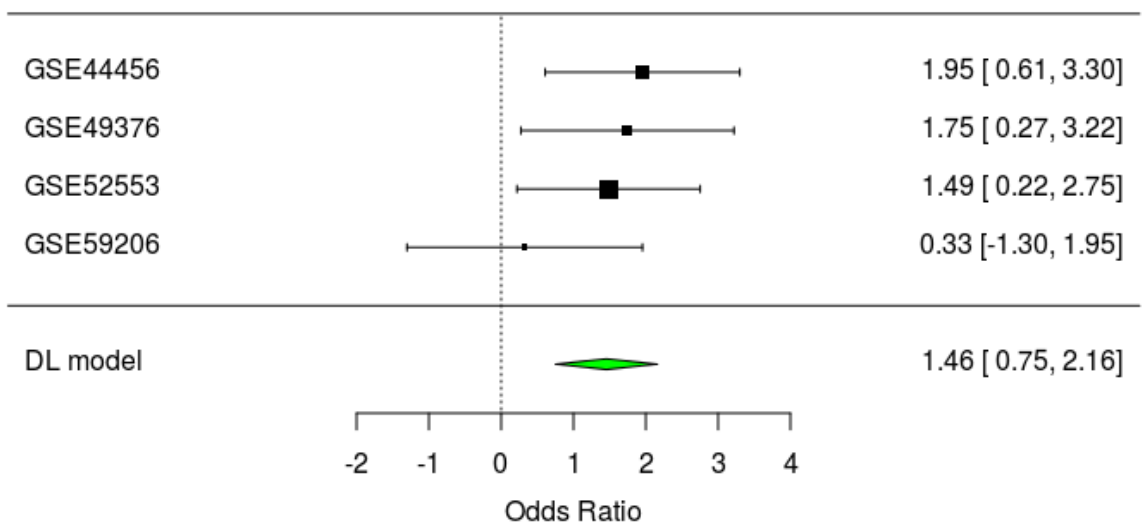
**Figura A.15:** Gráfico de bosque para el término GO:0035724.



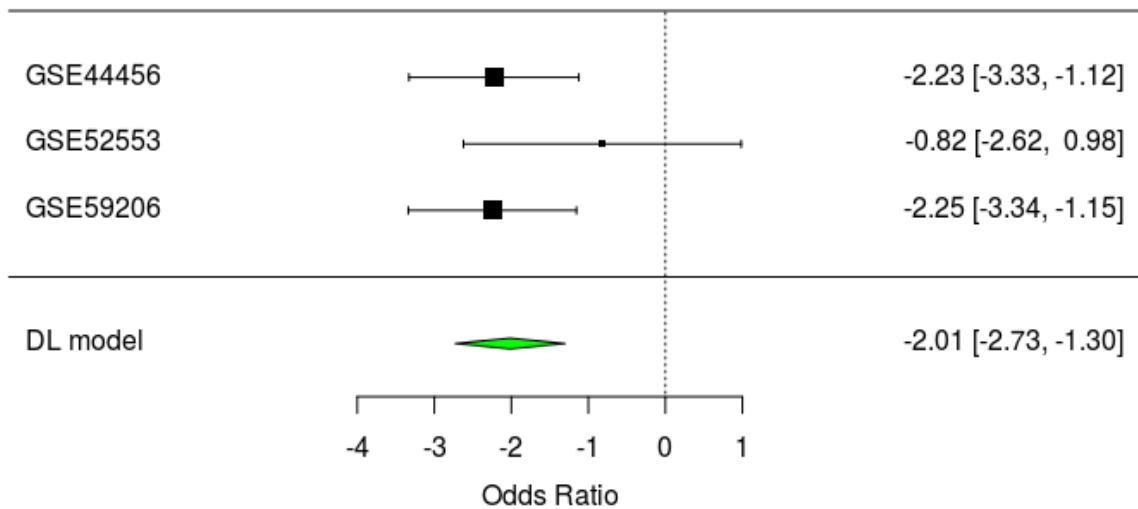
**Figura A.16:** Gráfico de bosque para el término GO:0061763.



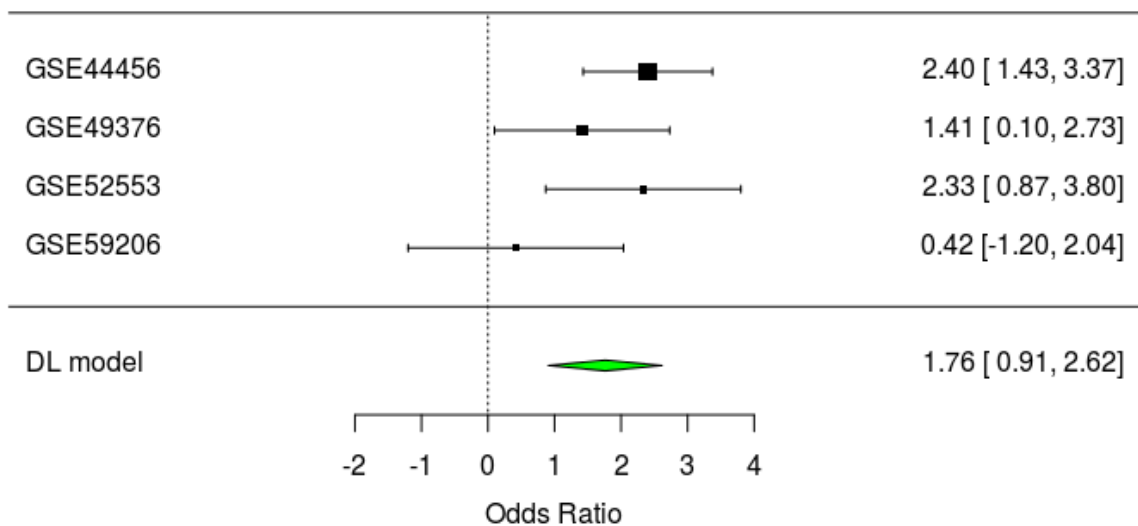
**Figura A.17:** Gráfico de bosque para el término GO:1901492.



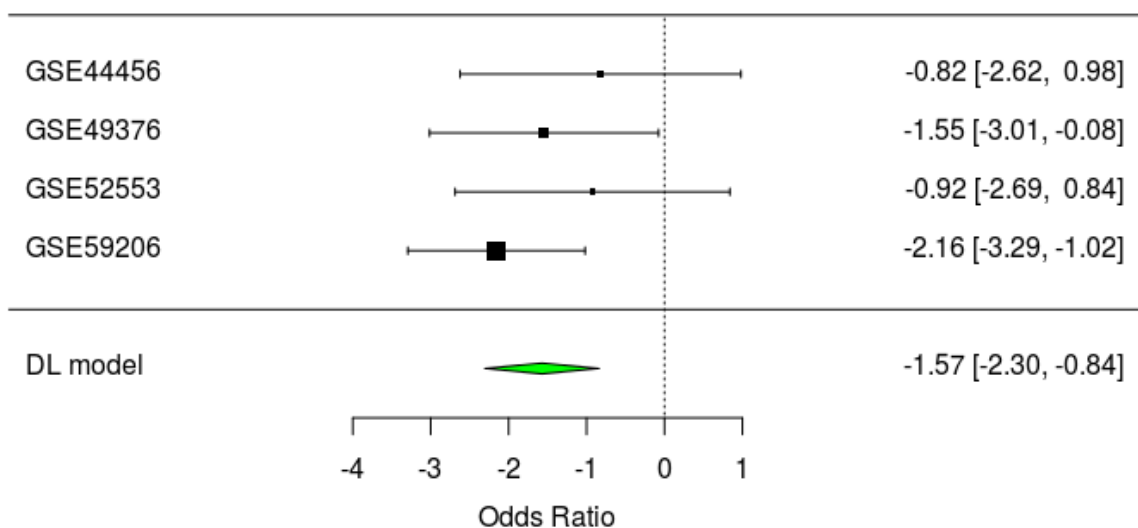
**Figura A.18:** Gráfico de bosque para el término GO:2000474.



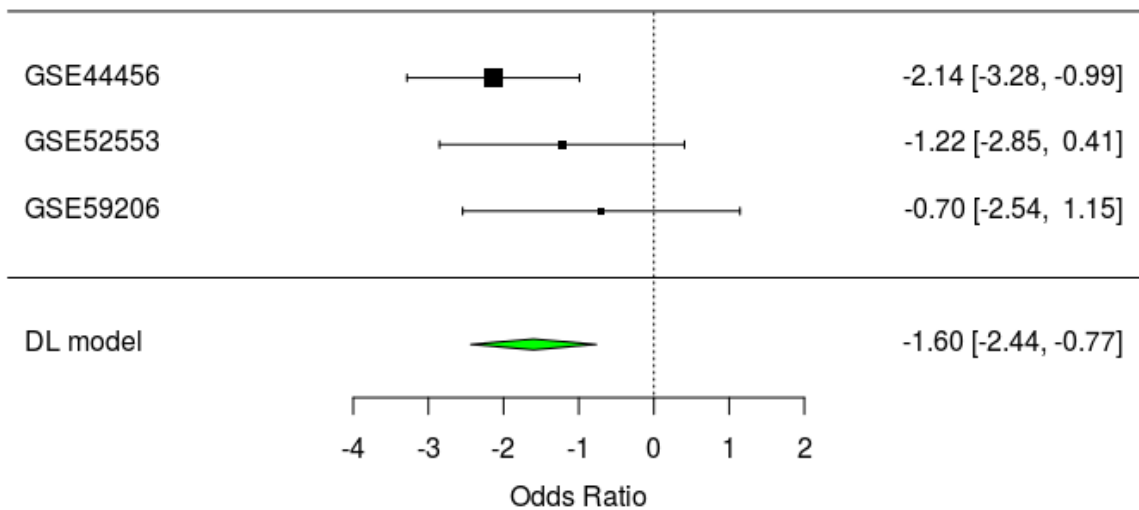
**Figura A.19:** Gráfico de bosque para el término GO:2000565.



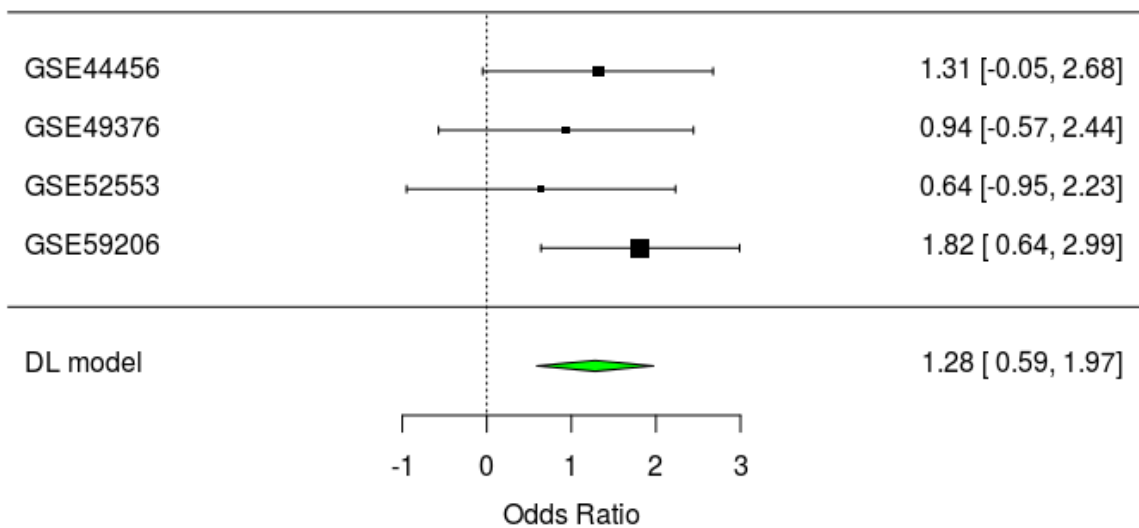
**Figura A.20:** Gráfico de bosque para el término GO:0098675.



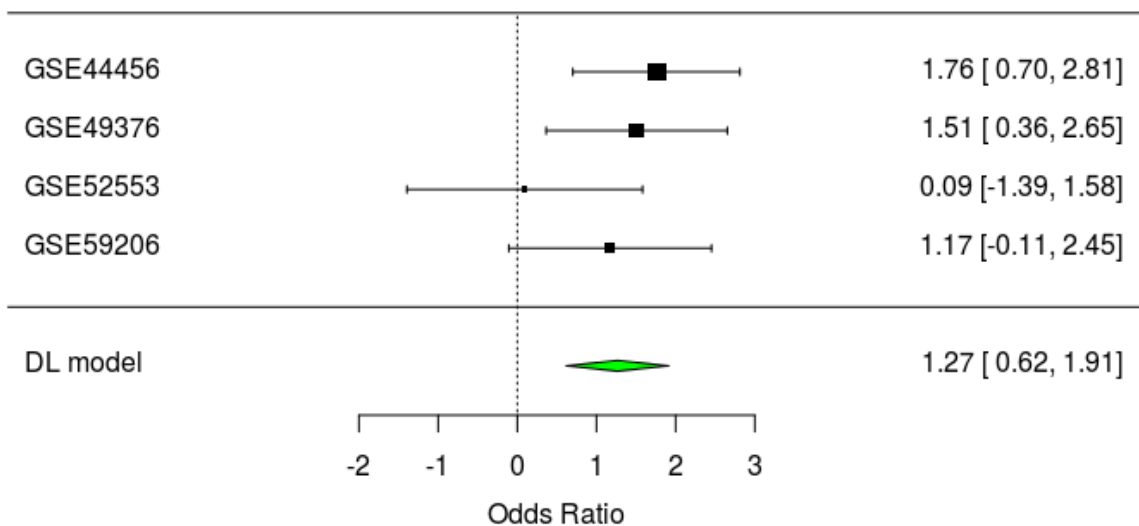
**Figura A.21:** Gráfico de bosque para el término GO:0003882.



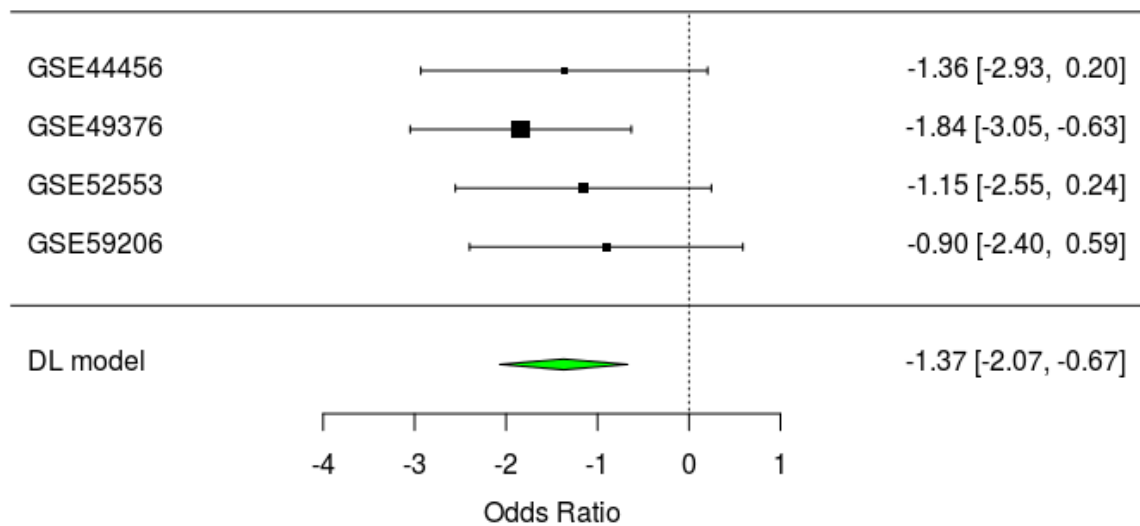
**Figura A.22:** Gráfico de bosque para el término GO:0004380.



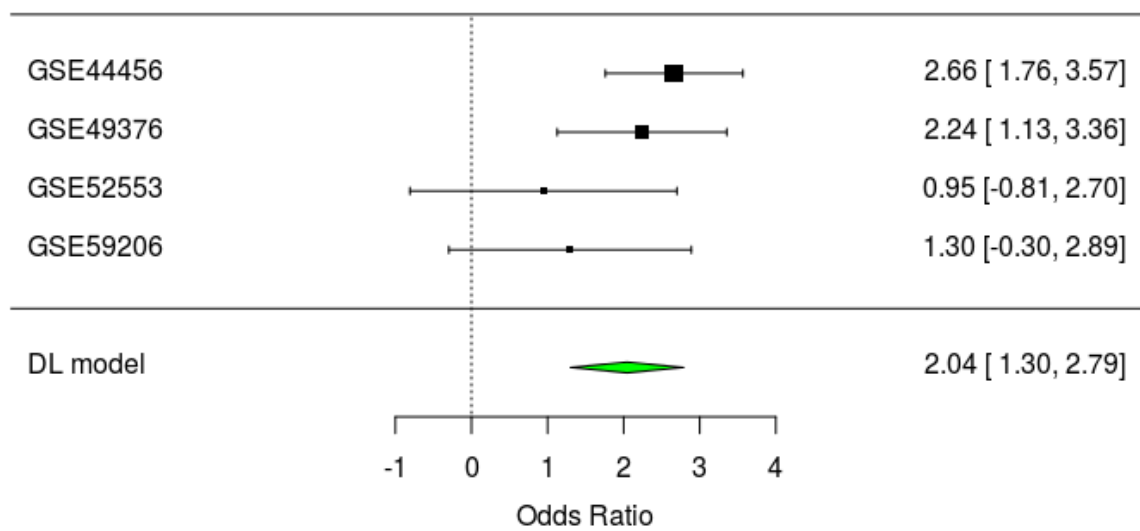
**Figura A.23:** Gráfico de bosque para el término GO:0016418.



**Figura A.24:** Gráfico de bosque para el término GO:0031997.



**Figura A.25:** Gráfico de bosque para el término GO:0047635.



**Figura A.26:** Gráfico de bosque para el término GO:0102131.

## Anexo B - Tablas

**Tabla B.1:** Librerías de R usadas en el transcurso de este trabajo y sus versiones.

<b>Paquete</b>	<b>Versión</b>
affy	1.62.0
annotate	1.62.0
AnnotationDbi	1.44.0
Biobase	2.42.0
biomaRt	2.38.0
dplyr	0.7.8
edgeR	3.24.3
genefilter	1.66.0
GEOquery	2.50.5
ggplot2	3.1.0
GO.db	3.8.2
hgu133plus2.db	3.2.3
hipathia	2.0.0
hugene10sttranscriptcluster.db	8.7.0
illuminaHumanv4.db	1.26.0
limma	3.38.3
mdgsa	1.14.0
metafor	2.1-0
metap	1.1
org.Hs.eg.db	3.7.0
pd.hugene.1.0.st.v1	3.14.1
purrr	0.3.2
readxl	1.3.1
stringr	1.4.0
sva	3.32.1
tidyr	0.8.3
UpSetR	1.3.3

**Tabla B.2:** Términos GO significativos de la ontología de Procesos biológicos y sus nombres. Se muestra también el LOR, su intervalo de confianza al 95%, y el p-valor ajustado por BH. (Ocupa dos páginas)

<b>ID</b>	<b>Nombre</b>	<b>LI 95%</b>	<b>LOR</b>	<b>LS 95%</b>	<b>FDR</b>
GO:0002030	inhibitory G protein-coupled receptor phosphorylation	-3,2053	-2,1367	-1,0681	0,0462
GO:0021529	spinal cord oligodendrocyte cell differentiation	-2,0318	-1,3914	-0,7511	0,0211
GO:0021530	spinal cord oligodendrocyte cell fate specification	-2,0318	-1,3914	-0,7511	0,0211
GO:0021822	negative regulation of cell motility involved in cerebral cortex radial glia guided migration	0,8688	1,6741	2,4794	0,0338
GO:0031583	phospholipase D-activating G protein-coupled receptor signaling pathway	-2,3257	-1,6059	-0,8860	0,0165
GO:0035724	CD24 biosynthetic process	0,9513	1,8878	2,8243	0,0448
GO:0042313	protein kinase C deactivation	-2,3257	-1,6059	-0,8860	0,0165
GO:0043179	rhythmic excitation	-2,3257	-1,6059	-0,8860	0,0165
GO:0046587	positive regulation of calcium-dependent cell-cell adhesion	1,3979	2,0136	2,6292	0,0000
GO:0048211	Golgi vesicle docking	0,7859	1,5022	2,2186	0,0304
GO:0060466	activation of meiosis involved in egg activation	0,9513	1,8878	2,8243	0,0448
GO:0061763	multivesicular body-lysosome fusion	0,7699	1,4323	2,0946	0,0213
GO:0061833	protein localization to tricellular tight junction	1,2605	1,9434	2,6262	0,0001
GO:0071701	regulation of MAPK export from nucleus	0,8477	1,5720	2,2962	0,0211
GO:0072303	positive regulation of glomerular metanephric mesangial cell proliferation	0,9860	1,6808	2,3757	0,0040
GO:0097156	fasciculation of motor neuron axon	0,8391	1,5463	2,2536	0,0211
GO:0120158	positive regulation of collagen catabolic process	-2,7278	-2,0144	-1,3009	0,0001
GO:1901492	positive regulation of lymphangiogenesis	-2,3692	-1,6169	-0,8645	0,0226

GO:1901585	regulation of acid-sensing ion channel activity	-2,9590	-2,0920	-1,2250	0,0040
GO:1901999	homogentisate metabolic process	-2,4680	-1,7854	-1,1029	0,0007
GO:1902000	homogentisate catabolic process	-2,4680	-1,7854	-1,1029	0,0007
GO:1904323	regulation of inhibitory G protein-coupled receptor phosphorylation	-3,2053	-2,1367	-1,0681	0,0462
GO:1904325	positive regulation of inhibitory G protein-coupled receptor phosphorylation	-3,2053	-2,1367	-1,0681	0,0462
GO:1905802	regulation of cellular response to manganese ion	-2,7764	-2,0762	-1,3760	0,0000
GO:2000438	negative regulation of monocyte extravasation	0,9513	1,8878	2,8243	0,0448
GO:2000474	regulation of opioid receptor signaling pathway	0,7513	1,4562	2,1610	0,0360
GO:2000559	regulation of CD24 biosynthetic process	0,9513	1,8878	2,8243	0,0448
GO:2000560	positive regulation of CD24 biosynthetic process	0,9513	1,8878	2,8243	0,0448
GO:2000565	negative regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell proliferation	-2,7278	-2,0144	-1,3009	0,0001
GO:2000569	regulation of T-helper 2 cell activation	0,8255	1,5514	2,2773	0,0226
GO:2000570	positive regulation of T-helper 2 cell activation	0,8255	1,5514	2,2773	0,0226

**Tabla B.3:** Términos GO significativos de la ontología de Componentes celulares y sus nombres. Se muestra también el LOR, su intervalo de confianza al 95%, y el p-valor ajustado por BH.

ID	Nombre	LI 95%	LOR	LS 95%	FDR
GO:0098675	intrinsic component of neuronal dense core vesicle membrane	0,9073	1,7613	2,6154	0,0268
GO:0098956	intrinsic component of dense core granule membrane	0,9073	1,7613	2,6154	0,0268
GO:0099012	neuronal dense core vesicle membrane	0,9073	1,7613	2,6154	0,0268
GO:0099066	integral component of neuronal dense core vesicle membrane	0,9073	1,7613	2,6154	0,0268

**Tabla B.4:** Términos GO significativos de la ontología de Funciones moleculares y sus nombres. Se muestra también el LOR, su intervalo de confianza al 95%, y el p-valor ajustado por BH. (Ocupa dos páginas)

ID	Nombre	LI 95%	LOR	LS 95%	FDR
GO:0003882	CDP-diacylglycerol-serine O-phosphatidyltransferase activity	-2,3041	-1,5721	-0,8400	0,0120
GO:0004021	L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase activity	-2,0688	-1,3702	-0,6715	0,0237
GO:0004313	[acyl-carrier-protein] S-acyltransferase activity	0,7319	1,5022	2,2726	0,0237
GO:0004316	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADPH) activity	0,7319	1,5022	2,2726	0,0237
GO:0004334	fumarylacetoacetase activity	-2,4680	-1,7854	-1,1029	0,0002
GO:0004380	glycoprotein-fucosylgalactoside alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase activity	-2,4376	-1,6016	-0,7656	0,0289
GO:0004381	fucosylgalactoside 3-alpha-galactosyltransferase activity	-2,4376	-1,6016	-0,7656	0,0289
GO:0004491	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (acylating) activity	-2,8012	-1,8873	-0,9734	0,0186
GO:0008336	gamma-butyrobetaine dioxygenase activity	-2,4886	-1,8203	-1,1521	0,0001
GO:0008897	holo-[acyl-carrier-protein] synthase activity	1,2790	1,9167	2,5544	0,0000
GO:0016418	S-acyltransferase activity	0,5912	1,2812	1,9712	0,0440
GO:0018478	malonate-semialdehyde dehydrogenase (acetylating) activity	-2,8012	-1,8873	-0,9734	0,0186
GO:0018549	methanethiol oxidase activity	-3,1793	-2,3984	-1,6175	0,0000

GO:0019171	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase activity	0,7319	1,5022	2,2726	0,0237
GO:0031707	endothelin A receptor binding	-2,3257	-1,6059	-0,8860	0,0064
GO:0031997	N-terminal myristoylation domain binding	0,6171	1,2655	1,9139	0,0237
GO:0033961	cis-stilbene-oxide hydrolase activity	-2,5614	-1,8084	-1,0554	0,0017
GO:0045517	interleukin-20 receptor binding	0,8763	1,6877	2,4991	0,0186
GO:0047117	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADPH, A-specific) activity	0,7319	1,5022	2,2726	0,0237
GO:0047451	3-hydroxyoctanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase activity	0,7319	1,5022	2,2726	0,0237
GO:0047620	acylglycerol kinase activity	0,7236	1,4726	2,2217	0,0237
GO:0047635	alanine-oxo-acid transaminase activity	-2,0688	-1,3702	-0,6715	0,0237
GO:0052894	norspermine:oxygen oxidoreductase activity	-3,0798	-2,0680	-1,0562	0,0192
GO:0052895	N1-acetylspermine:oxygen oxidoreductase (N1-acetylspermidine-forming) activity	-3,0798	-2,0680	-1,0562	0,0192
GO:0070123	transforming growth factor beta receptor activity, type III	-2,5853	-1,9482	-1,3111	0,0000
GO:0070191	methionine-R-sulfoxide reductase activity	-2,7273	-1,8881	-1,0489	0,0060
GO:0098695	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor activity involved in regulation of postsynaptic cytosolic calcium levels	1,3016	2,0447	2,7879	0,0001
GO:0102131	3-oxo-glutaryl-[acp] methyl ester reductase activity	0,7319	1,5022	2,2726	0,0237
GO:0102132	3-oxo-pimeloyl-[acp] methyl ester reductase activity	0,7319	1,5022	2,2726	0,0237