

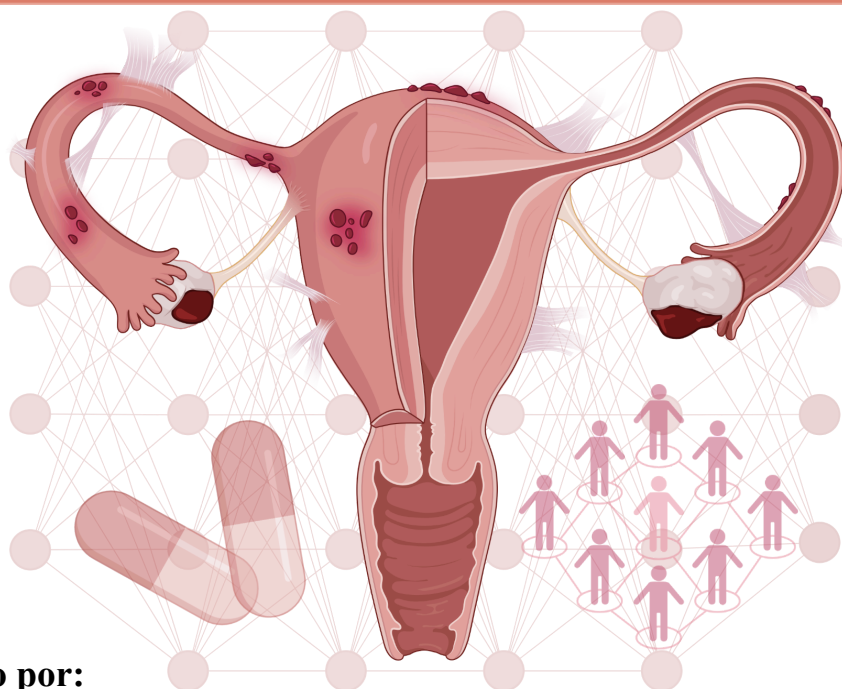
Programa de doctorado en Biomedicina y Farmacia



[] Facultad de Farmacia

Farmacología de sistemas en el tratamiento de la endometriosis

Pablo García Acero



Supervisado por:

Dra. Patricia Díaz Gimeno
Dra. María José Herrero Cervera
Dr. Salvador Francisco Aliño Pellicer

Valencia
Abril, 2024



Farmacología de sistemas en el tratamiento de la endometriosis

Valencia, abril de 2024



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Dra. Patricia Díaz Gimeno, Licenciada en biología y Doctora en ginecología y obstetricia por la Universidad de Valencia, Investigadora principal Miguel Servet en el Instituto de Investigación Sanitaria La Fe y líder del grupo de Medicina Reproductiva Genómica y de Sistemas en Fundación IVI.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: “**Farmacología de sistemas en el tratamiento de la endometriosis**” ha sido realizado íntegramente por **Pablo García Acero** bajo su dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente certificación en Valencia, a 22 de abril de 2024.

Fdo. Patricia Díaz Gimeno



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Dra. María José Herrero Cervera, Licenciada y Doctora en biología por la Universidad de Valencia, profesora ayudante doctora del departamento de farmacología de la facultad de medicina de la Universidad de Valencia e investigadora postdoctoral del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de la plataforma de farmacogenética.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: “**Farmacología de sistemas en el tratamiento de la endometriosis**” ha sido realizado íntegramente por **Pablo García Acero** bajo su dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente certificación en Valencia, a 22 de abril de 2024.

Fdo. María José Herrero Cervera



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Dr. Salvador Francisco Aliño Pellicer, Licenciado y Doctor en medicina por la Universidad de Valencia, Catedrático y Profesor Emérito de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: “**Farmacología de sistemas en el tratamiento de la endometriosis**” ha sido realizado íntegramente por **Pablo García Acero** bajo su dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente certificación en Valencia, a 22 de abril de 2024.

Fdo. Salvador Francisco Aliño Pellicer

“No entiendes realmente algo a menos que seas capaz de explicárselo a tu abuela”

- **Albert Einstein**

AGRADECIMIENTOS

Siento que este apartado de agradecimientos necesitaría casi la misma extensión que el propio manuscrito de esta tesis. El camino para llegar a esta meta de mi vida profesional ha sido arduo y, a veces, incluso tortuoso. Podría contar las veces que he pensado seriamente en “tirar la toalla” y no permitirme el lujo de afrontar el último sprint que me ha hecho llegar a escribir estas palabras. Sin embargo, prefiero enfocar las siguientes fases en agradecer todo el conocimiento que he adquirido durante el trayecto, tanto a nivel profesional como personal, y en las maravillosas personas que he ido encontrando y que, de una manera u otra, han despejado mi camino de piedras y, si en alguna he tropezado, ellos estaban ahí para levantarme.

La primera persona a la que me gustaría agradecer la posibilidad de realizar esta tesis es, como no, a mi directora y “lideresa”, Patricia Díaz. No encuentro las palabras adecuadas para agradecerte todo lo que has hecho por mí. En primer lugar, me ofreciste la posibilidad de incorporarme a tu, entonces, “pequeño grupo de investigación” y que con el paso de los años se ha multiplicado gracias a tu esfuerzo y dedicación. Desde el principio, me hiciste tener una visión completamente diferente de lo que es la ciencia y la investigación. He de reconocer que al iniciar mi TFM en el grupo de GSRM estaba un poco asustado, pues no sabía realmente dónde me estaba metiendo. Todo parecía nuevo para mí en lo que se refería a los conocimientos necesarios para formar parte de este gran grupo. Bioinformática, genómica, reproducción humana, farmacología de sistemas...todo sonaba muy bien, pero la dificultad intrínseca de lidiar con los nuevos términos y las metodologías innovadoras de cada una de estas disciplinas y darle un sentido para realizar una tesis doctoral me abrumaba. Además, el reto añadido de comenzar una nueva línea de investigación en el grupo desde cero, suponía una gran inquietud para mí, la cual hacía plantearme si realmente sería capaz de conseguir mis objetivos. No obstante, la confianza que siempre has depositado en mí, me ha dado alas para volar y tener una visión periférica (“*top-down*”), tanto de los problemas que he ido encontrando por el camino, como de la ciencia en general. Gracias, gracias y mil gracias por tu apoyo tanto profesional como personal, por ser como una madre en algunos momentos difíciles, por hacerme más fuerte, ayudarme a superarme día a día y ver que siempre hay una salida, y por aportarme tus conocimientos. Eres una persona digna de admirar y te estaré eternamente agradecido por todo.

Me gustaría mostrar también mi agradecimiento a mis otros directores de tesis, María José Herrero y Salvador Aliño, sin los que esta tesis tampoco habría sido posible. Gracias por acogerme con tanta calidez, amabilidad y comprensión. Gracias por la agilidad en las gestiones y la burocracia administrativa que tanto odiamos todos los que vivimos en este mundo. Gracias por vuestro interés, vuestros valiosos consejos, vuestra implicación y el aporte de otra visión diferente a esta tesis. María José, gracias por tu cercanía y simpatía. Eres una gran profesional, comprometida con tu trabajo y es evidente que disfrutas con lo que haces y lo trasmites a la perfección. Estoy seguro de que tienes un gran futuro profesional por delante. Has sido un gran incentivo para mí. Salvador, gracias por formar parte de la dirección de esta tesis. Es un verdadero honor contar con una persona con una trayectoria profesional tan impecable, talentosa y repleta de éxitos. Gracias también a los seis miembros del tribunal por aceptar mi invitación, a pesar de su carga de trabajo.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, que día a día son los que me soportan. Habéis sido testigos de mis buenos momentos y me habéis dado aliento para seguir adelante en los malos momentos. Me gustaría agradecer especialmente a Patricia Sebastián y a Almudena por su complicidad y su cercanía. Patricia, tu aportación a nivel profesional ha sido vital para desarrollar esta tesis. Gracias por transmitirme tus conocimientos en estadística y programación de un modo tan didáctico, por tu paciencia, por los momentos de cigarro y consejo emocional, por mostrarme tu valiosa navaja de Ockham, por los mails del viernes que me han hecho desconectar, por tus momentos de madre caldosa y estar ahí siempre que lo he necesitado. Almudena, te conozco desde el principio de mi carrera. Estudiamos juntos, luego nuestros caminos se separaron temporalmente y el destino los volvió a conectar. Todavía recuerdo el primer día que llegué a FIVI, asustado, tímido, sin conocer a nadie. Hasta que apareciste y me hiciste sentir como en casa. Cuando pienso en ti, sólo me vienen palabras de agradecimiento. Contigo he aprendido que la resiliencia existe realmente. Siempre has estado ahí en los momentos en los que me sentía solo ante la adversidad. Admiro tu capacidad de trabajo, incluso en los momentos complicados y sé que te espera un futuro profesional lleno de éxitos, porque te lo mereces. Gracias también al resto de compañeros, los que están y los que ya se marcharon, por alegrarme el día con vuestras conversaciones (disparatadas a veces) cargadas de buen rollo. A los “andaluces”: Antonio, Ismael, Pepi, María y Alejandro. A los “no andaluces”: Diana, Asunta, Nataly, Rebeca, Elena, María Salvalada y, especialmente a Fran, por tus chistes malos que tanto me gustan y por tus consejos de sabio caballero. Gracias, Ali, por enmendar mis torpezas en el laboratorio

siempre con una sonrisa en la cara y por tu sencillez a la hora de explicar las cosas. Gracias a los compañeros de congresos (especialmente a Hannes) y al resto de FIVI. A los colegas de almuerzos, comidas y alguna que otra cerveza (no todo va a ser trabajar). Gracias, Marcos y Silvia, por ser como sois, por vuestra sinceridad y por vuestro sentido del humor. Sois más que unos compañeros para mí.

Fuera del ámbito científico está mi segunda familia, mis amigos de toda la vida. Es difícil expresar toda mi gratitud en unas líneas. Me habéis acompañado todo el camino sin soltarme de la mano. Siempre he sentido vuestra compañía y cercanía y me siento agradecido por todos los buenos momentos que me habéis brindado. Por esas cervezas en una terraza, por las risas, por vuestra lealtad, porque, a pesar de que pasa el tiempo, somos inseparables. Gracias, en especial, a mis amigos Abel, Xema, Jorge, José Carlos y Verdú. Sin vosotros este camino habría sido más difícil. Tampoco puedo olvidar a mis compañeros que me han acompañado desde la carrera. Gracias Iván, Jaime y Kanko por esos buenos momentos. Cada vez nos vemos con menos frecuencia, pero sé que siempre tendré vuestra amistad y alguien con quién contar en los momentos difíciles. También me gustaría incluir en estas líneas a mis profesores de instituto: Feli y Pareja. Gracias por vuestro modo de enseñar biología. Transmitís alegría allá donde vais y hacéis que algo tan complicado sea muy fácil de entender. Gracias a vuestra fascinante visión de la biología me impulsastéis a estudiar una carrera tan bonita.

A mi compañera de viaje y de vida, Alesya. Gracias por aparecer en mi vida como un rayo de esperanza. Gracias por enseñarme a ver el mundo desde otra perspectiva. Por estar siempre a mi lado, a pesar de la distancia. Por tu apoyo incondicional y por hacerme mejor persona. Eres la luz que ilumina mi camino. A mi familia. Debería escribir “FAMILIA”, en mayúsculas. Tengo mucha suerte de teneros a mi lado. Gracias por motivarme para seguir adelante cuando más lo necesitaba. Gracias por hacer que nunca me falte de nada y luchar a mi lado para que mis sueños se hagan realidad. Sin vosotros no sería lo que hoy soy. Me habéis enseñado lo que es la valentía, la fortaleza, la bondad, la responsabilidad, la motivación para hacer frente a mis miedos. Saber que siempre estaréis ahí cuando más lo necesite es mi mayor tesoro. No me olvido de los que ya no estáis entre nosotros: abuelita, Mamen, Bueli, Guillermo. Os llevo muy dentro de mí allá donde vaya y siento la energía que me transmitís. No cabe mi gratitud para todos ni en 1.000 páginas. ¡GRACIAS!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Anatomía, morfología y fisiología del sistema reproductor femenino.....	1
2. El endometrio humano.....	2
3. Endometriosis.....	3
3.1. Manifestaciones clínicas de la enfermedad.....	3
3.2. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.....	6
3.3. Principales limitaciones en el tratamiento de la endometriosis.....	10
3.4. Biomarcadores de la endometriosis.....	12
3.5. Modelos para el estudio de la endometriosis.....	14
4. Redes Moleculares.....	16
4.1. Teoría de grafos.....	16
4.2. Tipos de redes biológicas.....	17
4.2.1. Redes de interacción proteína-proteína (IPP) y el Interactoma Humano.....	18
4.3. Parámetros de red.....	20
5. Farmacología de sistemas.....	25
5.1. Definición y características de la farmacología de sistemas.....	25
5.2. Estrategias de reposicionamiento de fármacos mediante farmacología de sistemas.....	29
5.3. Farmacología de sistemas para el estudio de la efectividad y seguridad farmacológica.....	30
5.3.1. Parámetros de red aplicados a la priorización de fármacos efectivos.....	31
5.3.2. Polifarmacología y promiscuidad de fármacos.....	31
5.3.3. Farmacogenética y farmacogenómica.....	32
5.4. Bases de datos para la integración de datos <i>ómicos</i>	33
6. Hipótesis dirigida por datos.....	36
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	40

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño experimental.....	44
2. Construcción del Interactoma Humano.....	46
3. Selección de genes de endometriosis e infertilidad asociada.....	47
3.1. Genes relacionados con el desarrollo y progresión de la endometriosis y la infertilidad asociada.....	47
3.2. Genes relacionados con la predisposición al desarrollo de la endometriosis.....	51
4. Modelado de la red molecular de endometriosis e infertilidad asociada.....	51

4.1. Estudio de las relaciones moleculares entre los genes de endometriosis, la infertilidad asociada y la predisposición genética a la enfermedad: construcción de la red de endometriosis.....	51
4.2. Priorización de dianas moleculares y fármacos/compuestos para la endometriosis y la infertilidad asociada.....	54
5. Análisis comparativo de la eficacia a nivel molecular entre los fármacos/compuestos candidatos para reposicionamiento en endometriosis y los tratamientos actuales.....	55
6. Análisis de la seguridad de los fármacos/compuestos candidatos para reposicionamiento en endometriosis.....	56
7. Validación en la literatura del mecanismo de acción de los fármacos/compuestos candidatos para el tratamiento de la endometriosis y la infertilidad asociada.....	57
8. Análisis <i>in vitro</i> de la eficacia de los fármacos/compuestos candidatos priorizados contra la endometriosis.....	58
8.1. Aislamiento de células epiteliales endometriales y selección de dosis de compuestos candidatos en biopsias endometriales de donantes sanas.....	58
8.2. Ensayo de viabilidad celular en HEEC y 12Z.....	58

RESULTADOS

1. Selección de genes de enfermedad.....	62
2. Construcción del Interactoma Humano.....	66
3. Modelo sistémico de la endometriosis para la priorización de fármacos/compuestos candidatos.....	67
3.1. Modelado de la red de endometriosis.....	67
3.2. Selección de fármacos aprobados para reposicionamiento en endometriosis.....	69
3.3. Selección de fármacos actuales para el tratamiento de la endometriosis.....	70
3.4. Modelo basado en farmacología de sistemas para la priorización de fármacos/compuestos en endometriosis.....	73
4. Evaluación de la efectividad a nivel molecular de los fármacos/compuestos candidatos priorizados para reposicionamiento en endometrios.....	75
5. Evaluación de la seguridad de los fármacos/compuestos candidatos priorizados para reposicionamiento en endometriosis.....	76
6. Validación en la literatura: mecanismos de acción de los fármacos/compuestos candidatos priorizados para reposicionamiento en endometriosis.....	79
7. Validación <i>in vitro</i> de los fármacos/compuestos candidatos en una línea celular de endometriosis.....	80
8. Mecanismos de acción de los compuestos candidatos.....	84

DISCUSIÓN.....	87
----------------	----

CONCLUSIONES.....	103
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	106
BIBLIOGRAFÍA.....	115

ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
3D	3 Dimensiones
ABCG2	<i>ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2</i> (Miembro 5 de la Subfamilia G de Transportadores de Casetes de Unión a ATP)
ACACB	<i>Acetyl-CoA Carboxylase Beta</i> (Acetil-CoA Carboxilasa Beta)
ACP1	<i>Acid Phosphatase 1</i> (Fosfatasa Ácida 1)
ADME	Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADReCS	Adverse Drug Reaction Classification System
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AHR	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i> (Receptor de Hidrocarburos de Arilo)
AINEs	Antiinflamatorios no Esteroideos
AKT	Serine/Threonine-Protein Kinase (Proteína Serina/Treonina Quinasa)
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i> (Proteína Quinasa Activada por AMP)
APRT	<i>Adenine Phosphoribosyltransferase</i> (Adenina Fosforribosiltransferasa)
ARN	Ácido Ribonucleico
ASRM	American Society for Reproductive Medicine
cMAP	Connectivity Map
CO₂	<i>Carbon Dioxide</i> (Dióxido de Carbono)
COS	<i>Controlled Ovarian Stimulation</i> (Estimulación Ovárica Controlada)
CTD	The Comparative Toxicogenomics Database
CYP1B1	<i>Cytochrome P450 Family 1 Subfamily B Member 1</i> (Citocromo P450 Familia 1 Subfamilia B Miembro 1)
DAPK1	<i>Death Associated Protein Kinase 1</i> (Proteína Quinasa 1 Asociada a la Muerte)
DEG	<i>Differentially Expressed Gene</i> (Gen Expresado Diferencialmente)
DGIdb	Drug Gene Interaction Database
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i> (Quinasa Regulada por Señales Extracelulares)
ESE	<i>Early Secretory</i> (Secretora Temprana)
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
ESR	<i>Estrogen Receptor</i> (Receptor de Estrógenos)

ESR1	<i>Estrogen Receptor 1</i> (Receptor de Estrógenos 1)
ESR2	<i>Estrogen Receptor 2</i> (Receptor de Estrógenos 2)
FAERS	FDA Adverse Event Reporting System
FDA	Food and Drug Administration
FOL	Follicular
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> (Hormona Foliculoestimulante)
GEO	Gene Expression Omnibus
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i> (Hormona Liberadora de Gonadotropina)
GnRH-a	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist</i> (Agonista del Receptor de la Hormona Liberadora de Gonadotropina)
GnRH-ant	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone Antagonist</i> (Antagonista del Receptor de la Hormona Liberadora de Gonadotropina)
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i> (Estudio de Asociación de Genoma Completo)
HCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i> (Gonadotropina Coriónica Humana)
HEEC	<i>Human Endometrial Epithelial Cells</i> (Células Epiteliales Endometriales Humanas)
HR	Human Reproduction
HuRI	Human Reference Interactome
IA	Inhibidor de la Aromatasa
IL	<i>Interleukin</i> (Interleucina)
IPP	Interacción Proteína-Proteína
ITGA5	<i>Integrin Subunit Alpha 5</i> (Subunidad Alfa 5 de la Integrina)
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KDR	<i>Kinase Insert Domain Receptor</i> (Receptor de Dominio de Inserto Quinasa)
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> (Hormona Luteinizante)
LUT	Lútea
MANTRA	Mode of Action by Neetwork Analysis
MAPPIT	<i>Mammalian Protein-Protein Interaction Trap</i> (Trampa de Interacción Proteína-Proteína de Mamíferos)
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (Proteína Quinasa Activada por Mitógenos)
mL	Mililitro
MMP2	<i>Matrix Metalloproteinase 2</i> (Metaloproteínasa de Matriz 2)
MMP9	<i>Matrix Metalloproteinase 9</i> (Metaloproteínasa de Matriz 9)
MSE	<i>Mild Secretory</i> (Secretora Media)
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i> (Diana de Mamíferos de la Rapamicina)
mTORC1	<i>Mammalian Target of Rapamycin Complex 1</i> (Diana de Mamíferos del Complejo de la Rapamicina 1)
MPA	<i>Medoxyprogesterone Acetate</i> (Acetato de Medoxiprogesterona)

MTAP	<i>Methylthioadenosine Phosphorylase</i> (Metiltioadenosina Fosforilasa)
MTS	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
n/d	No Disponible
NADH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i> (Nicotinamida Adenina Dinucleótido)
NAPPA	<i>Nucleic Acid Programmable Protein Array</i> (Matriz de Proteínas Programables de Ácido Nucleico)
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i> (Secuenciación de Nueva Generación)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PC1	<i>Principal Component 1</i> (Componente Principal 1)
PC2	<i>Principal Component 2</i> (Componente Principal 2)
PCA	<i>Protein-fragment Complementation Assay</i> (Ensayo de Complementación de Fragmentos de Proteínas)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análisis de Componentes Principales)
PDB	Protein Data Bank
PGR	<i>Progesterone Receptor</i> (Receptor de Progesterona)
PharmGKB	Pharmacogenomics Knowledgebase
PheGenI	Phenotype-Genotype Integrator
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-Kinase</i> (Fosfatidilinositol-3-Quinasa)
PRO	Proliferativa
RMA	<i>Robust Multichip Average</i>
RNAseq	<i>RNA Sequencing</i> (Secuenciación de ARN)
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa)
SBF	Suero Bovino Fetal
SE	<i>Standard Error</i> (Error Estándar)
SEC	Secretora
SEF	Sociedad Española de Fertilidad
SERM	<i>Selective Estrogen Receptor Modulator</i> (Modulador Selectivo del Receptor de Estrógenos)
SIDER	Side Effect Resource
SNS	Sistema Nacional de Salud
SPRM	<i>Selective Progesterone Receptor Modulator</i> (Modulador Selectivo del Receptor de Progesterona)
SRC	<i>SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase</i> (Protooncogén Tirosina-Proteína Quinasa SRC)
SRPK2	<i>SRSF Protein Kinase 2</i> (SRSF Proteína Quinasa 2)

TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Factor de Necrosis Tumoral alfa)
TRA	Tratamiento de Reproducción Asistida
VCAM1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i> (Molécula de Adhesión de Células Vasculares 1)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular)
VEGFA	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i> (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A)

Introducción

“El futuro tiene muchos nombres.
Para los débiles es lo inalcanzable.
Para los temerosos, lo desconocido.
Para los valientes es la oportunidad.”

- *Victor Hugo*

1. Anatomía, morfología y fisiología del sistema reproductor femenino

El útero humano (**Figura 1**) es un órgano exclusivo de las mujeres, cuya principal función consiste en albergar el cigoto para su implantación, que posteriormente dará lugar a la formación de un embrión y al desarrollo del feto. Presenta una estructura hueca, musculosa, de paredes gruesas y con forma de pera invertida. Tiene una longitud de 6,5-7,5 centímetros, una anchura de 4,5-5,5 centímetros y un grosor que oscila entre los 2,5 y los 3 centímetros. La estructura uterina está formada por dos regiones que difieren en cuanto a forma y función (Ramírez-González et al., 2016):

- **Cuerpo uterino:** es la región principal y más grande del órgano. Se compone de músculo liso y tiene la capacidad de expandirse durante el embarazo para albergar al feto en crecimiento. Consta de una estructura trilaminar: el perimetrio (capa externa), el miometrio (capa muscular media) y el endometrio (capa interna).
- **Cuello uterino (cérvix):** forma la parte inferior y estrecha del útero que se abre hacia la vagina. Está compuesto principalmente por tejido conectivo y tiene un canal central que conecta la cavidad uterina con la vagina. El cuello uterino juega un papel clave en el parto, ya que se dilata para permitir el paso del bebé durante el parto.

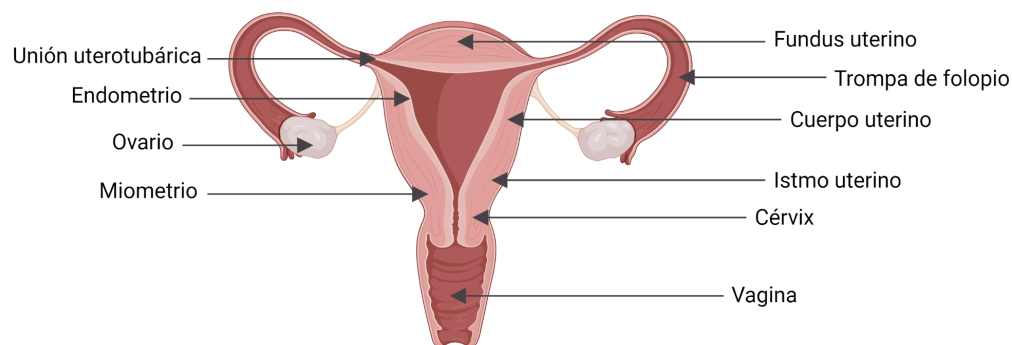


Figura 1. Anatomía del útero humano. El útero humano está compuesto por una estructura trilaminar y diferentes regiones que conforman el cuerpo uterino y el cuello uterino (cérvix). El fundus uterino se localiza en la parte superior del útero y, junto con el cuerpo uterino, conforma los dos tercios de la parte superior del útero. La unión uterotubárica es la zona entre el útero y la trompa de falopio, la cual se localiza entre el fundus y el cuerpo uterino. El cérvix, separado del cuerpo uterino por el istmo uterino, conecta el útero con la vagina.
Creado con BioRender.com

La morfología uterina varía en función del ciclo menstrual y del estado reproductivo de la mujer. Durante el ciclo menstrual el útero pasa por cambios en su grosor y tamaño debido a las hormonas que lo regulan.

En cuanto a la fisiología, el útero tiene varias funciones vitales, a saber:

- **El ciclo menstrual:** durante el ciclo menstrual el endometrio se engrosa y se prepara así para la implantación del óvulo fertilizado. Si no se produce la fertilización, este revestimiento se desintegra y da lugar a la menstruación.
- **Embarazo:** durante el embarazo el útero se expande significativamente para alojar al feto en crecimiento.
- **Parto:** durante el parto el útero produce contracciones coordinadas para expulsar al bebé a través del canal del parto (vagina).

El útero es un órgano fundamental en la reproducción y tiene una complejidad, tanto estructural como funcional, que lo hace esencial en el desarrollo humano.

2. El endometrio humano

El endometrio humano es la capa mucosa que tapiza el interior del útero, y consta de un epitelio simple, cilíndrico, con o sin cilios, glándulas y un estroma. Es rico en tejido conjuntivo y está altamente vascularizado. Su función es alojar al cigoto después de la fecundación, permitiendo así su implantación. Es el lugar donde se desarrolla la placenta, y presenta alteraciones cíclicas en sus glándulas y vasos sanguíneos durante el ciclo menstrual (Emera et al., 2012), en preparación para la implantación del embrión.

El endometrio es un tejido altamente dinámico y con la capacidad de sufrir cambios fisiológicos en respuesta a las hormonas esteroideas, con el objetivo final de crear un estado receptivo de manera sincronizada con la llegada del blastocisto durante la ventana de implantación entre los días 19 y 21 del ciclo menstrual (Wilcox et al., 1999). Este dinamismo orquestado por las hormonas femeninas se hace visible durante todo el ciclo menstrual (**Figura 2**), que dura unos 28 días y que consta de varias fases: la proliferativa, la secretora y la menstrual (Armstrong et al., 2017; Hawkins & Matzuk, 2008). La fase proliferativa

endometrial coincide con la denominada fase folicular en el ovario, y la fase secretora con la fase lútea. En lo referido a las hormonas ováricas implicadas, aquellas que juegan un papel más importante son la hormona luteinizante (*Luteinizing Hormone*, LH) y la hormona foliculoestimulante (*Follicle Stimulating Hormone*, FSH), hormonas procedentes del eje hipotálamo-hipofisario, junto con los estrógenos y progesterona. Ambos ciclos, el ovárico y el menstrual, se encuentran acoplados y regulados por las hormonas ováricas.

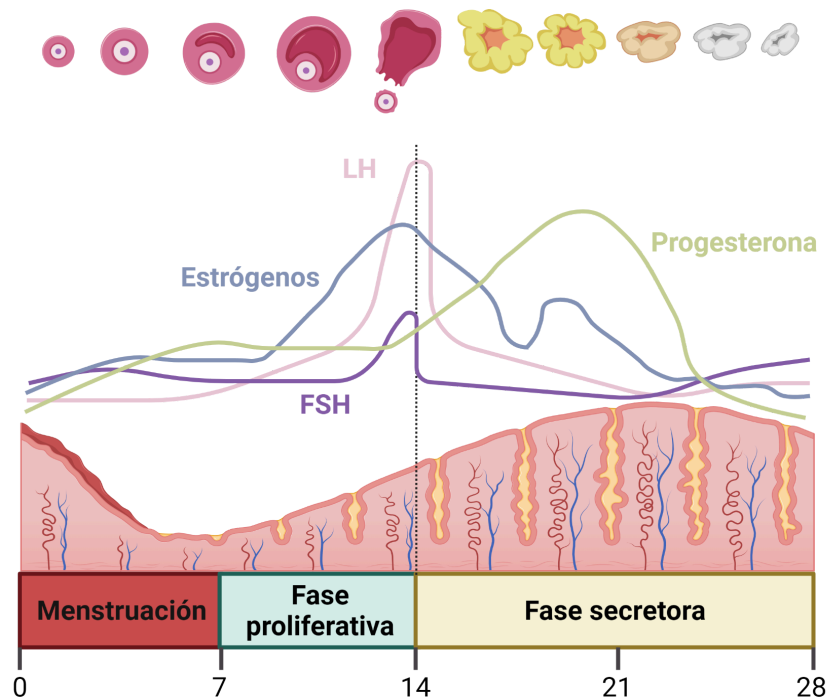


Figura 2. Ciclo ovárico y menstrual en humanos. El ciclo ovárico se divide en dos fases (folicular y lútea) y está regulado por la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH). Por otro lado, el ciclo menstrual está regulado por las hormonas ováricas (progesterona y estrógenos) y se compone de tres fases principales: menstruación, fase proliferativa y fase secretora (secretora temprana, secretora media y secretora tardía). *Creado con BioRender.com*

3. Endometriosis

3.1. Manifestaciones clínicas de la enfermedad

La endometriosis es la causa más común de dolor pélvico y subfertilidad, y se caracteriza por el crecimiento del tejido endometrial fuera del útero (Burney & Giudice, 2012) (**Figura 3**).

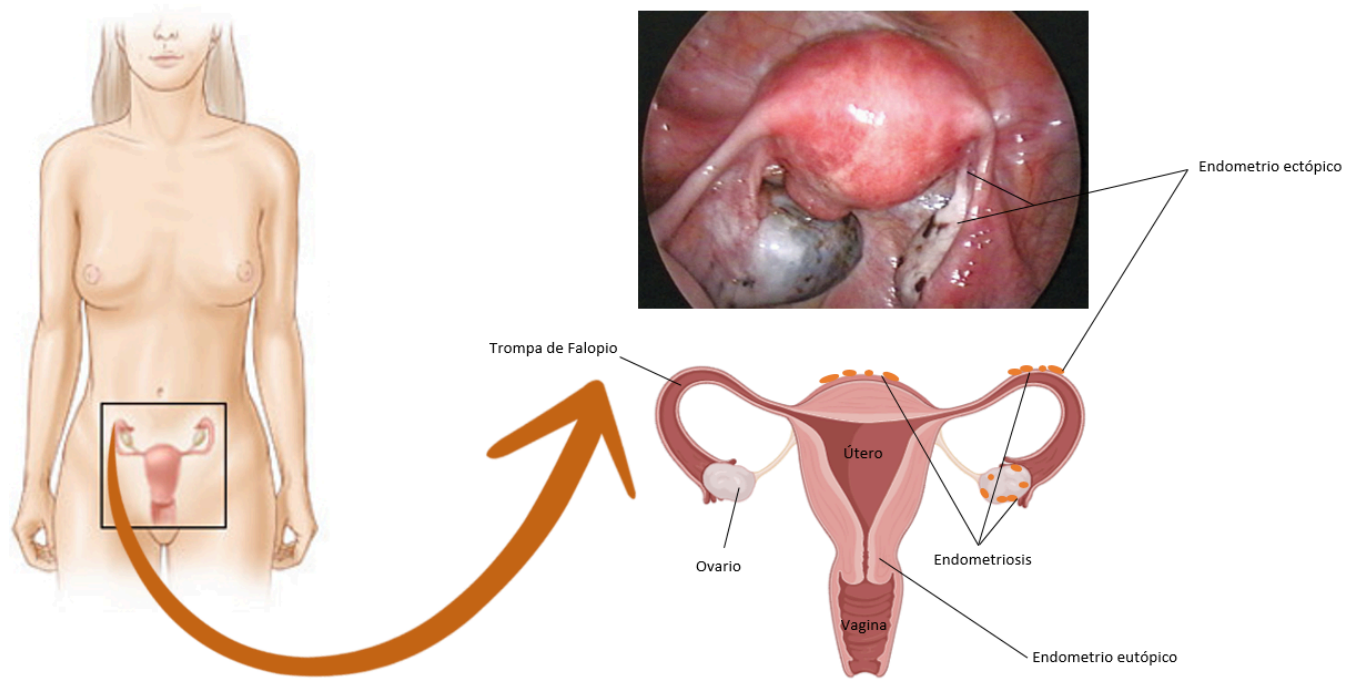


Figura 3. Representación visual del desarrollo de la endometriosis. Se muestra la anatomía del útero y el crecimiento de tejido producto de la aparición de la endometriosis, diferenciando el tejido eutópico, que es el propio endometrio, y el ectópico, que es el tejido endometrial que ha migrado y se encuentra fuera del endometrio.

La endometriosis es una enfermedad que afecta a entre el 6 % y el 10 % de mujeres en edad reproductiva, al 50-60 % de mujeres y adolescentes con dolor pélvico y a más del 50 % de mujeres con infertilidad. La endometriosis es una patología que se caracteriza por la dependencia de estrógenos para desarrollar el crecimiento de los implantes endometriósicos. Existen varias teorías acerca de las causas de esta patología, pero la más extendida y aceptada es la de la menstruación retrógrada. Dicha teoría afirma que el origen de la endometriosis está en la liberación de tejido fuera del útero durante la menstruación, produciendo así una respuesta inflamatoria. Esta respuesta va acompañada de angiogénesis, adherencias, fibrosis, cicatrización, infiltración neuronal y distorsión anatómica, resultando en un dolor persistente y dando lugar a infertilidad en algunos casos (Berkley et al., 2005). Se estima que, en parejas normales, la tasa de fecundidad está en torno a 0,15 y 0,20 por mes. Por contra, las mujeres con endometriosis tienden a tener una tasa más baja, la cual oscila entre 0,02 y 0,1 (Hughes et al., 1993). La endometriosis también ha sido asociada a una menor tasa de recién nacidos vivos (Collins et al., 1995), y algunos estudios concluyen que las mujeres infértiles tienen más probabilidad de sufrir endometriosis que las mujeres fértiles (Verkauf, 1987). A pesar de los extensos estudios que se han llevado a cabo, no existe un consenso común acerca de la

relación entre la endometriosis y la infertilidad. Entre los mecanismos propuestos se incluyen algunos como una anatomía pélvica distorsionada, anomalías endocrinas u ovulatorias o una función peritoneal alterada (Bulletti et al., 2010). Por otro lado, la aparición de la endometriosis ha sido asociada a la de otras enfermedades crónicas como el cáncer, las autoinmunes, el asma y las cardiovasculares (Kvaskoff et al., 2015). Entre los síntomas asociados encontramos algunos como dolor pélvico crónico, fatiga, dismenorrea, dispareunia, disuria o disquecia (Nnoaham et al., 2011).

En lo referente a los factores implicados en la enfermedad, han sido asociados los genéticos (Rahmioglu et al., 2014), los genéticos familiares (Montgomery et al., 2008) y los ambientales (ftalatos, bisfenol A o contaminantes organoclorados) (Buck Louis et al., 2013; Porpora et al., 2013), así como los hábitos alimenticios (Parazzini et al., 2004). Se estima que el componente genético que contribuye a la variabilidad fenotípica (heredabilidad) es de alrededor del 50 % (Nyholt et al., 2009; Saha et al., 2015; Treloar et al., 1999). Según el criterio de la ASRM (*American Society for Reproductive Medicine*), existen varias clasificaciones de la endometriosis basadas en la localización y el tamaño de las lesiones (Alimi et al., 2018). Concretamente, se han establecido cuatro estadios diferentes asociados al grado de desarrollo de la enfermedad (**Figura 4**):

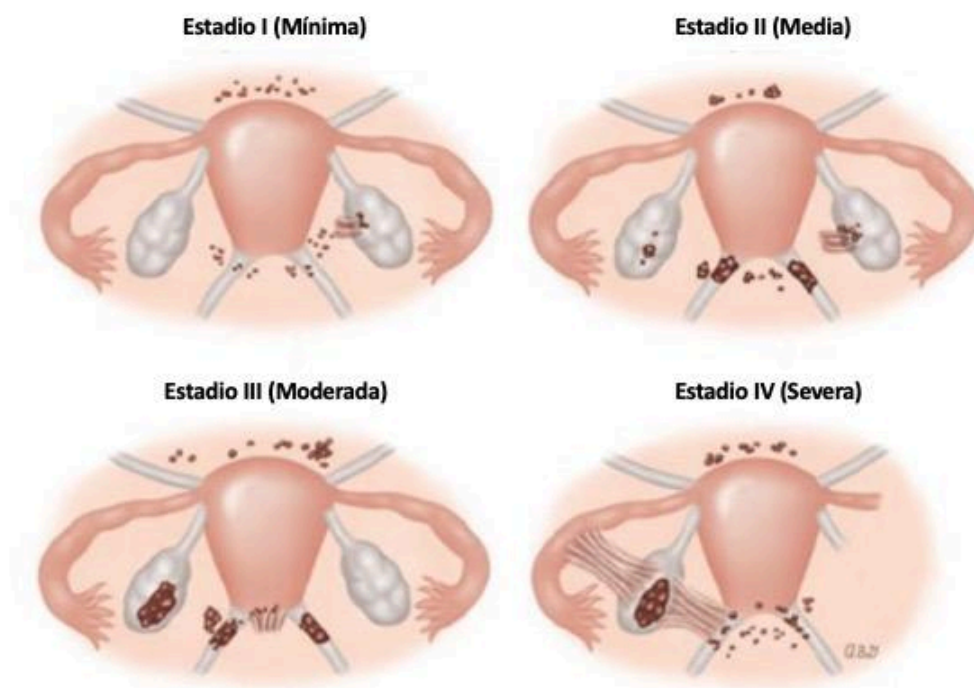


Figura 4. Estadios de endometriosis según los criterios de clasificación de la ASRM. Se consideran cuatro estadios diferentes: Estadio I (mínima), caracterizado por presentar implantes aislados y sin adherencias; estadio

II (media), en el que se localizan implantes superficiales de menos de 5 cm, adheridos o diseminados sobre la superficie del perineo u ovarios; estadio III (moderada), en el que se observan múltiples implantes superficiales o invasivos, así como adherencias alrededor de las trompas; estadio IV (severa), que muestra implantes múltiples superficiales y profundos, los cuales incluyen grandes endometromas ováricos, además de posibles adherencias extensas. *Fuente: Sistema Nacional de Salud (SNS) de España. Modificado de Sharma y colaboradores (2022)*

A pesar de su prevalencia, de los sustanciales costes asociados al tratamiento (Simoens, Hummelshoj, et al., 2011; Simoens et al., 2011) y del impacto en la calidad de vida (Nnoaham et al., 2011), la etiología de la endometriosis todavía no es del todo conocida. No obstante, existe evidencia de la implicación de las hormonas femeninas, inflamación local y disrupción del sistema inmunológico en el desarrollo de la enfermedad (Burney & Giudice, 2012; Matarese et al., 2003).

3.2. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad

Actualmente no existe una terapia farmacológica concreta que permita revertir la enfermedad completamente, por lo que las terapias vigentes están dirigidas a paliar los síntomas (Bedaiwy et al., 2017). En muchas ocasiones, tras cesar el tratamiento, los síntomas vuelven a aparecer de nuevo, y se estima que, tras su finalización, alrededor del 21,5 % de las pacientes presenta una recurrencia de la enfermedad a los dos años, y el 40-50 % a los cinco años (Guo, 2009).

Existen algoritmos de toma de decisión que predicen el tratamiento óptimo para la enfermedad y la infertilidad asociada, en función de las características de la paciente, de la efectividad o efectos secundarios de los tratamientos y de sus deseos de quedar embarazada o de someterse a tratamientos de reproducción asistida (**Figura 5**). Entre los criterios considerados para que un tratamiento sea considerado seguro y efectivo podemos encontrar los siguientes (Bedaiwy et al., 2017):

- Tratamiento curativo en lugar de supresivo
- Tratamiento del dolor y de la infertilidad al mismo tiempo
- Perfil de efectos secundarios aceptable
- Su uso prolongado debe de ser seguro y asequible
- De naturaleza no anticonceptiva

- Sin interferencia con ovulación espontánea e implantación normal
- Mejora la concepción espontánea
- Sin potencial teratogénico y seguro durante el periodo periconcepcional
- Inhibe el crecimiento de lesiones ya existentes
- Previene el desarrollo de nuevas lesiones
- Eficacia para todos los fenotipos de endometriosis

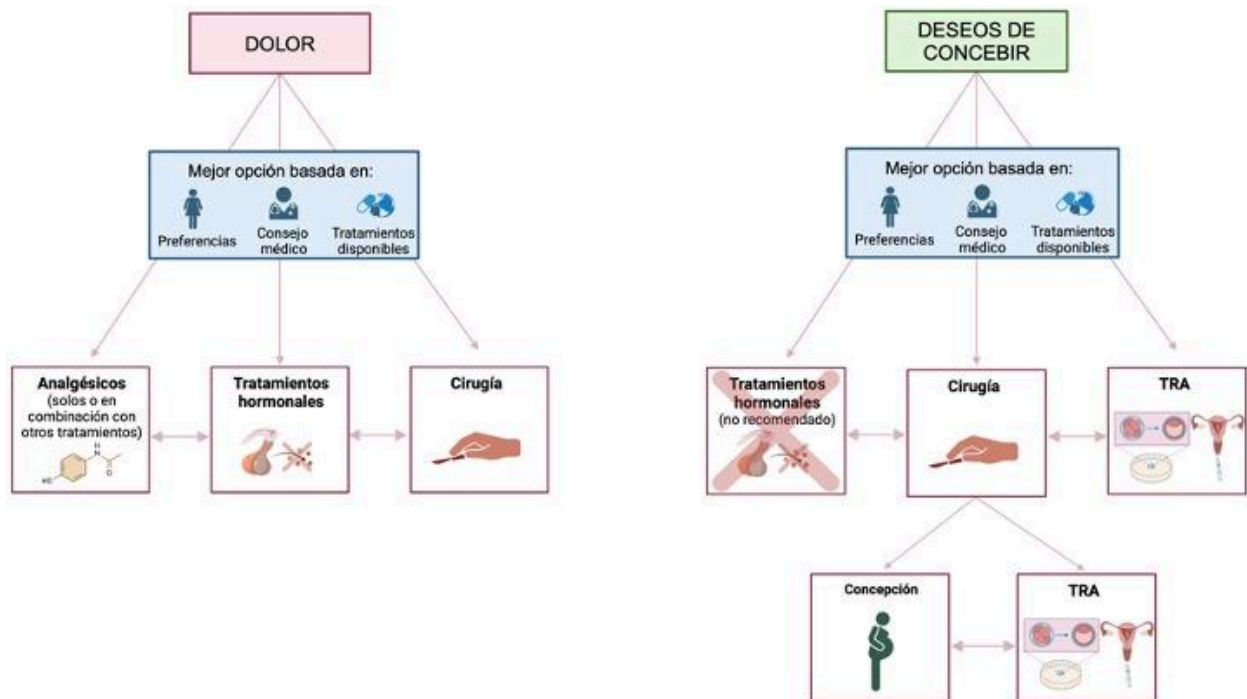


Figura 5. Algoritmo de toma de decisiones para el tratamiento de la endometriosis. Se muestran las diferentes opciones para el tratamiento del dolor asociado a la endometriosis y de las opciones en caso de deseo de concepción de la mujer. El tratamiento a elegir depende de factores como las preferencias de la mujer, el consejo médico o los tratamientos disponibles. Entre los posibles tratamientos del dolor (izquierda) se encuentran los analgésicos, los hormonales y la cirugía. Para mujeres con deseos de concepción (derecha) no se recomiendan los tratamientos hormonales, y se ofrece la opción de cirugía y/o tratamientos de reproducción asistida (TRA). *Modificado de ESHRE Guideline on Endometriosis (2022). Creado con BioRender.com*

Podemos clasificar los tratamientos actuales en dos grupos: farmacológicos y quirúrgicos. Hay que considerar que la cirugía puede afectar a la reserva ovárica de las pacientes (Bedaiwy et al., 2017). Además, la mitad de las mujeres que se someten a cirugía sin un control de la medicación, a largo plazo deben someterse a una complementaria, la cual puede resultar en un daño orgánico que da lugar a la pérdida de función (Saraswat et al., 2018).

Los actuales tratamientos farmacológicos (**Figura 6**) implican, en su mayoría, el uso de anticonceptivos que bloquean el eje hipotálamo-hipofisario-ovárico e inducen la supresión de la ovulación. Consecuentemente, la atrofia endometrial asociada a la terapia hormonal dificulta la implantación, lo que representa un reto para pacientes con endometriosis y deseos de quedar embarazadas. Como consecuencia, en mujeres con deseos de concepción y con dolor asociado a endometriosis, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son la única opción factible para mantener la fertilidad. Para llevar a cabo la supresión hormonal, los análogos o agonistas de la GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*) son empleados usualmente como primera línea de tratamiento, debido a su alta efectividad en la supresión hormonal, acompañada de la inhibición del crecimiento de tejido endometrial. Otro de los tratamientos estudiados en la actualidad está relacionado con la sensibilización del sistema central, el cual ha sido asociado como un factor clave en la sensibilidad al dolor causado por la endometriosis (Brawn et al., 2014). Este tipo de tratamientos son recomendados para algunas pacientes, y entre ellos podemos encontrar algunos como los fármacos tetracíclicos o los antiepilépticos, aunque su evidencia clínica es limitada. Adicionalmente, para las pacientes es recomendable realizar un enfoque multidisciplinar que incluya terapias como la fisioterapia o la atención psicológica (Friggi Sebe Petrelluzzi et al., 2012).

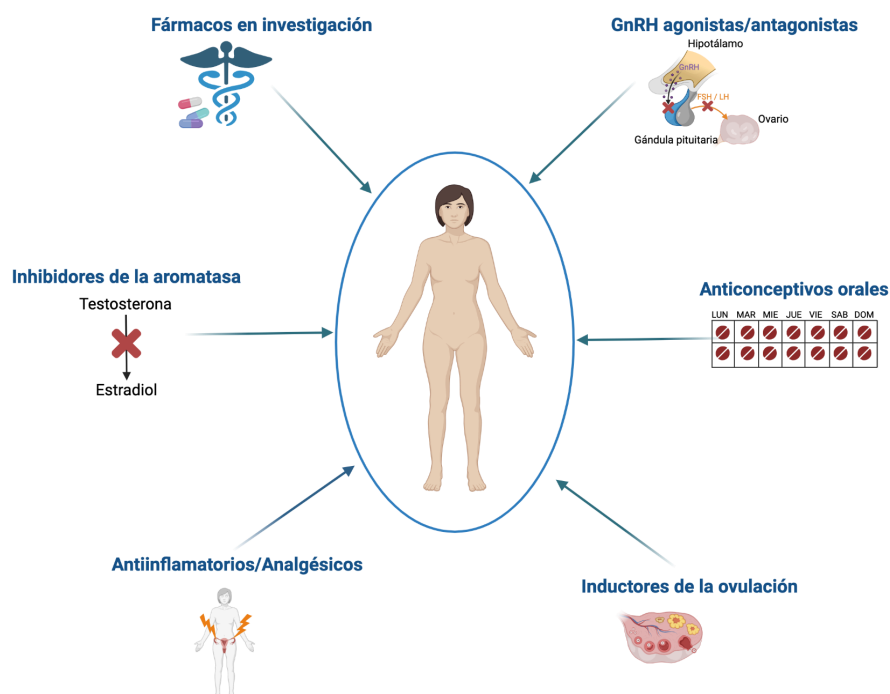


Figura 6. Tratamientos farmacológicos actuales para la endometriosis. Se pueden diferenciar dos tipos de tratamientos farmacológicos distintos en función de su modo de acción: los hormonales y los no hormonales. En función de las características de la paciente y sus necesidades, se pueden plantear diferentes tipos de opciones de tratamiento. *Creado con BioRender.com*

En las dos últimas décadas se han testado una gran cantidad de nuevas opciones de tratamientos. Todos ellos están dirigidos a revertir alguna condición específica relacionada con la endometriosis. Entre los tratamientos hormonales más prometedores, los antagonistas de la GnRH han sido unos de los más empleados contra la endometriosis. Estos producen un ambiente hipoestrogénico mediante la supresión directa de la gonadotropina pituitaria. Este mecanismo da lugar a la inhibición de la proliferación e invasión celular inducidas por el factor de necrosis tumoral (TNF- α), al mismo tiempo que mantiene los niveles de estradiol a fin de evitar síntomas vasomotores en las células estromales del endometrio (Taniguchi et al., 2013). Otro tipo de fármacos estudiados en la actualidad para el tratamiento de la endometriosis son los moduladores selectivos de los receptores de progesterona (*Selective Progesterone Receptor Modulators*, SPRM), que presentan efectos beneficiosos mediante la inhibición de los implantes endometriósicos y reducen el dolor (Chwalisz et al., 2005). También se han desarrollado fármacos moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (*Selective Estrogen Receptor Modulators*, SERM). Algunos de ellos han sido empleados en el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica y han mostrado efectos prometedores en la reducción de implantes endometriósicos (Yao et al., 2005). Finalmente, otro de los grupos de fármacos más estudiados en la actualidad para el tratamiento de la endometriosis es el de los inhibidores de la aromatasa. La aromatasa es una enzima clave en la biosíntesis de estrógenos, hormona estrechamente relacionada con el desarrollo de la enfermedad. Por tanto, la inhibición de la producción de estrógenos conlleva una reducción local de los implantes endometriósicos (Attar & Bulun, 2006; Bedaiwy et al., 2009; Bilotas et al., 2010).

En lo referido a los tratamientos no hormonales, los más estudiados son los inmunomoduladores y los agentes antiangiogénicos. Los inmunomoduladores actúan mediante el bloqueo de TNF- α , que es una citocina proinflamatoria cuyo incremento ha sido asociado con el desarrollo de la endometriosis (Bedaiwy et al., 2002). El bloqueo de esta proteína da lugar a una reducción significativa de las lesiones producidas por la enfermedad (Güney et al., 2008; Ingelmo et al., 2013; Xu et al., 2012). Por otro lado, los agentes antiangiogénicos tratan de evitar el proceso de angiogénesis, relacionado con la iniciación, crecimiento, invasión y recurrencia de la endometriosis. Una gran cantidad de agentes antiangiogénicos han sido evaluados, tanto en ratones (Becker et al., 2006; Bruner-Tran et al., 2009; Dabrosin et al., 2002) y ratas (Bruner-Tran et al., 2009) como en células humanas *in vitro* (Almassinokiani et al., 2013; Esfandiari et al., 2007; Sharma et al., 2010) para el

tratamiento de la endometriosis. Sin embargo, la eficacia clínica de estos es de evidencia limitada (Laschke & Menger, 2012).

3.3. Principales limitaciones en el tratamiento de la endometriosis

A pesar de la gran cantidad de tratamientos disponibles y bajo estudio, estas terapias suelen aliviar los síntomas, aunque en la mayoría de los casos la desaparición del dolor es limitada en eficacia y duración, por lo que los síntomas reaparecen (Dunselman et al., 2014). La mayoría de las terapias hormonales actuales se basan en la supresión de los niveles de estrógenos a nivel sistémico o local. Todas ellas muestran una eficacia similar. No obstante, el perfil de respuesta entre las diferentes pacientes es muy variable (Burney & Giudice, 2012). Los más usados comúnmente son las progestinas y los anticonceptivos orales combinados. Otros, como los GnRH-a (agonistas de GnRH), son también frecuentemente empleados. Este tipo de terapias inducen estados hipoestrogénicos, resultando en síntomas relacionados con la menopausia y con la pérdida de densidad mineral ósea (Lee et al., 2016). Fármacos como el Danazol, especialmente cuando es administrado por vía oral, están asociados con efectos secundarios androgénicos significativos, por lo que su uso ha sido restringido en la rutina médica. Además, analgésicos como los AINEs son prescritos para el tratamiento del dolor, a pesar de la limitada evidencia de su eficacia (Dunselman et al., 2014). Se ha sugerido que entre el 25 % y el 30 % de las pacientes tratadas con anticonceptivos o progestágenos requieren un tratamiento adicional debido a la falta de respuesta o baja tolerabilidad (Vercellini et al., 2008, 2014). También es necesario tener presente que la variabilidad asociada a los estudios clínicos puede influir en las conclusiones obtenidas sobre los efectos beneficiosos de un fármaco determinado. Es conocido el hecho de que alrededor del 39 % de eventos serios relacionados con la toma de fármacos, especialmente aquellos relacionados con el cáncer, no se reportan en ensayos clínicos, y el 49 % de los mismos no están descritos en las etiquetas de la FDA (Food and Drug Administration), organismo regulador de medicamentos en Estados Unidos (www.fda.gov).

En un meta-análisis (Becker et al., 2017) se comparó la eficacia de diferentes tratamientos empleados actualmente contra la endometriosis, así como la respuesta de la población a los mismos. En él se describe la falta de eficacia en seis estudios independientes, y la persistencia del dolor al finalizar la terapia fue descrita en catorce de ellos. La aparición de efectos adversos también juega un papel importante a la hora de la prescripción de uno u

otro medicamento. La mayoría de pacientes que interrumpen el tratamiento proceden de terapias en las que aparecen efectos adversos. Se estima que entre el 5 % y el 9 % de pacientes tratadas con progestinas, danazol, GnRH-a o GnRH-ant (antagonistas de GnRH) lo detienen en alguna fase debido a la falta de eficacia y a la aparición de efectos secundarios (Becker et al., 2017). Como conclusión de estos estudios se deriva la idea de que los mecanismos de acción de los tratamientos actuales sólo ofrecen el alivio de los síntomas, y, por el momento, no hay ninguna terapia con una efectividad total en la reversión de la enfermedad, por lo que podrían considerarse tratamientos simplemente paliativos. Además, y a pesar de que las terapias médicas actuales suprimen los síntomas asociados a la enfermedad, no todas las pacientes presentan la misma respuesta, observándose una efectividad variable. Si tenemos en cuenta el gasto asociado a las mismas, podemos concluir que existe una necesidad actual de desarrollar nuevas terapias, más efectivas y personalizadas. En un estudio en el que se evaluó el gasto asociado a estos tratamientos, se estimó que en Estados Unidos, durante el año 2009, fueron invertidos alrededor de 49 mil millones de dólares en el diagnóstico y tratamiento del dolor e infertilidad asociados a la endometriosis (Simoens et al., 2011). Actualmente, el único método de diagnóstico y evaluación del estado de la endometriosis y la recurrencia de la enfermedad después del tratamiento es la visualización durante la intervención quirúrgica (Burney & Giudice, 2012). Debido a la falta de eficacia comentada anteriormente, gran parte de las pacientes optan por el tratamiento quirúrgico. Entre los empleados en la actualidad, los más comunes son la laparoscopia y la histerectomía. La laparoscopia es una técnica quirúrgica que permite la visión de la cavidad pélvica-abdominal mediante el uso de una lente óptica. No obstante, la laparoscopia puede afectar a la reserva ovárica de las pacientes (Bedaiwy et al., 2017). Por otro lado, la histerectomía consiste en la extirpación total o parcial del útero. Otra de las soluciones propuestas consiste en la combinación de las terapias quirúrgicas y farmacológicas.

Para el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos al tratamiento de la endometriosis es necesario conocer las bases moleculares que dan lugar a la aparición de esta enfermedad compleja y poligénica. En la actualidad se están realizando muchos esfuerzos en esa dirección. Existen una gran cantidad de estudios y bases de datos dedicados a tal fin. Una de las estrategias consiste en considerar la enfermedad desde un punto de vista holístico y global, en lugar de estudiar por separado los diferentes componentes que dan lugar a su aparición. No obstante, este tipo de enfoque, a su vez, se basa en la integración de

información de diferentes experimentos independientes, por lo que estos últimos también se hacen necesarios para avanzar en el conocimiento de la enfermedad.

La endometriosis es una de las enfermedades reproductivas más estudiadas en medicina reproductiva por su prevalencia en la sociedad. Entre los procesos moleculares desregulados en endometriosis han sido descritos algunos como: apoptosis, angiogénesis, estrés oxidativo, inflamación y proliferación celular. Entre las rutas moleculares relacionadas con estos procesos moleculares destacan algunas como las de MAPK/ERK, AKT/PI3K o p38 MAPK (Samimi et al., 2019) (**Figura 7**).

Figura 7. Principales rutas y procesos moleculares desregulados en endometriosis. Se muestran algunos de los procesos y rutas moleculares desreguladas importantes para el desarrollo de la endometriosis. *Modificado de Samimi y colaboradores (2019)*

proteína mTORC1 y la hiporegulación de AMPK han sido asociadas a la infertilidad relacionada con la endometriosis, junto a la desregulación de otros procesos moleculares como la deciduización, proliferación celular, angiogénesis, inflamación o autofagia aberrante (Assaf et al., 2022), por lo que representan unos de los potenciales marcadores moleculares que podrían ser empleados para el tratamiento de la infertilidad asociada a la enfermedad.

En la actualidad existen gran cantidad de bases de datos dedicadas a almacenar información relativa a las diferentes moléculas que dan lugar a la aparición de diferentes enfermedades. Esta información puede ser muy valiosa para el desarrollo de nuevas terapias más dirigidas y personalizadas. La secuenciación del genoma humano ha abierto un amplio abanico de posibilidades para ello y para el estudio de muchas enfermedades complejas. Asimismo, la explosión de las diferentes tecnologías ómicas también ha contribuido a este propósito. Algunas de las más desarrolladas en la actualidad son la genómica y la transcriptómica.

En la **Tabla 1** se describen algunas de las bases de datos de carácter genómico relevantes para el estudio tanto de enfermedades monogénicas como de enfermedades poligénicas y complejas.

Tabla 1. Bases de datos genómicas para la extracción de genes de enfermedades complejas. Se muestra el nombre de la base de datos, la página web y la referencia bibliográfica.

Base de datos	Web	Referencia
GWAS Catalog	www.ebi.ac.uk/gwas/home	(Sollis et al., 2023)
HGMD	www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php	(Stenson et al., 2020)
GWAS Central	www.gwascentral.org	(Beck et al., 2014)
PheGenI	www.ncbi.nlm.nih.gov/gap/phegeni	(Ramos et al., 2014)

La tecnología basada en la transcriptómica también ofrece una información útil para el estudio de enfermedades complejas. Un procedimiento estándar para la obtención de genes candidatos para una enfermedad consiste en estudiar los niveles de expresión de genes en

pacientes con una enfermedad concreta con respecto al fenotipo normal. De este modo, los genes candidatos en los cuales se observa una diferencia significativa en la expresión entre los dos grupos podrían ser biomarcadores a tener en cuenta (de la Fuente, 2010; Nitsch et al., 2009). En lo referido a la endometriosis, se han realizado grandes esfuerzos para caracterizar la enfermedad a través de diferentes estudios de transcriptómica (Bhat et al., 2019; Burney et al., 2007; Crispi et al., 2013; Hever et al., 2007; Khan et al., 2012; Ohlsson et al., 2009; Tamaresis et al., 2014; Zhao et al., 2018).

Gene Expression Omnibus (GEO) (Clough & Barrett, 2016) es un repositorio público y gratuito de información extraída de experimentos de *microarray* y RNAseq (secuenciación de ARN). Esta clase de experimentos se basa en realizar medidas de los niveles de expresión de genes. Originariamente, la tecnología de *microarray* fue la primera desarrollada para este propósito. Sin embargo, con la introducción de la tecnología derivada de la secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing*, NGS), emergió el RNAseq, que ofrece una serie de ventajas con respecto a los *microarrays*, entre las que destacan el posible descubrimiento de nuevos genes (ya que la tecnología de *microarray* parte de sondas predeterminadas que se unen a genes ya conocidos) y la mayor resolución, ya que la tecnología de RNAseq es capaz de detectar la expresión a nivel de gen, exón, transcrito y ADN codificante. GEO cuenta actualmente con información sobre 4.348 *datasets*, 3.157.567 muestras de diferentes organismos y 19.931 plataformas diferentes, por lo que es un recurso ampliamente empleado en la investigación biomédica.

3.5. Modelos para el estudio de la endometriosis

Existen modelos *in vivo* y modelos *in vitro* para el estudio de la endometriosis. Los modelos *in vivo* permiten estudiar, de un modo relativamente rápido y sencillo, en comparación con el estudio en humanos, el efecto en el crecimiento anormal de tejido, el dolor y la infertilidad, así como la identificación de posibles tratamientos que puedan ser susceptibles de ser empleados en humanos. Debido a que la endometriosis sólo se desarrolla de manera espontánea en humanos y en algunos primates no humanos que tienen ciclos menstruales (D'Hooghe et al., 2009), el uso de animales como macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) o babuinos (*Papio hamadryas*) supone uno de los modelos más relevantes para el estudio de la endometriosis, pero su uso está limitado debido a los costes asociados y a cuestiones éticas derivadas del mismo. Otros modelos animales, como los roedores, ofrecen

una opción más tangible para el estudio de la enfermedad. No obstante, a pesar del hecho de que en estos animales se replican ciertos aspectos de la enfermedad (Flores et al., 2007; Konno et al., 2007), no simulan realmente la diseminación del tejido hacia el peritoneo y la formación de lesiones a partir del tejido endometrial desprendido. Esto, junto con la dificultad de encontrar un conveniente número de estas ratas comercialmente disponibles, hace que su uso se vea limitado en el estudio de la endometriosis.

En lo referente a los modelos *in vitro*, a pesar de que una de sus principales limitaciones es la falta de fidelidad en la reproducibilidad de algunas de las manifestaciones fisiológicas de la enfermedad, permiten el estudio del efecto de fármacos en células pertenecientes a diferentes tejidos de la misma de un modo relativamente sencillo y económico (Romano et al., 2020). Respecto a este tipo de modelos, existen varias opciones. Entre las más usadas cabe destacar el cultivo primario a partir de biopsias endometriales de pacientes y el uso de líneas celulares inmortalizadas (Fan, 2020). Sin embargo, el limitado número de células que pueden ser aisladas a partir de biopsias endometriales de pacientes y la mayor facilidad que supone trabajar con líneas celulares, además de la dificultad añadida de disponer de biopsias endometriales, son las razones por la que gran parte de los investigadores decide emplear líneas celulares para el estudio de la enfermedad.

Dependiendo del objetivo del estudio, existen diferentes líneas celulares que pueden ser empleadas. Debido a que el tejido endometrial humano se compone en su mayoría de células epiteliales y células estromáticas, las principales líneas celulares empleadas para el estudio de la fisiopatología de la endometriosis se basan en estos tipos celulares. Hay disponibles una variedad de líneas celulares endometriósicas inmortalizadas, tanto epiteliales, que incluyen algunas como las 12Z, 49Z, 108Z y la 11Z, como estromales, como el caso de las 22B (Fan, 2020). Mediante la comparación de estas células endometriósicas con células primarias endometriales normales, se ha observado una elevada expresión de genes relacionados con la regulación del metabolismo de hormonas esteroideas, especialmente los receptores de estrógenos (*ESR*) y progesterona (*PGR*), con la invasión celular (*MMP2* y *MMP9*), con el factor de crecimiento vascular endotelial (*VEGF*), con citoquinas (*IL*) o con el factor de necrosis tumoral (*TNF- α*) (Banu et al., 2008). No obstante, el uso de estos modelos celulares para el estudio de la endometriosis continúa en debate. Un trabajo reciente realizado por Romano y colaboradores (Romano et al., 2020), en el que se incluían 300 protocolos publicados describiendo el aislamiento y cultivo de células endometriósicas, concluyó que

existía una gran falta de reproducibilidad de los protocolos, debido, en gran medida, a la ausencia de pureza celular obtenida y de la caracterización fenotípica de los cultivos primarios, que presentan un alto riesgo de contaminación por tejidos circundantes. También fue revisada la autenticación de las líneas celulares y se observó que dicha autenticación no fue realizada (excepto en las líneas 11Z y 12Z).

Actualmente el cultivo de organoides en 3D también ofrece una posibilidad muy interesante de estudiar, tanto la endometriosis como el proceso de implantación embrionaria y el efecto farmacológico sobre los mismos (Boretto et al., 2019; Kagawa et al., 2022; Luddi et al., 2020).

4. Redes Moleculares

4.1. Teoría de grafos

Una de las herramientas más empleadas para el estudio de las enfermedades complejas y de todos los componentes que dan lugar a la aparición de las mismas es la visualización y análisis de redes moleculares mediante la teoría de grafos. Una red molecular representa interacciones complejas entre todas las entidades de un sistema biológico. Un grafo es una representación esquemática de las conexiones de una red, y, por tanto, permite visualizar las interacciones complejas entre todas las entidades de un sistema que dan lugar al fenómeno objeto de estudio, como podría ser el caso de las enfermedades complejas y poligénicas o el estudio de la acción farmacológica y las relaciones entre sus dianas moleculares y los genes de una enfermedad.

Matemáticamente, un grafo está formado por los vértices o nodos, los cuales representan entidades biológicas (como podrían ser genes, proteínas o metabolitos), y las aristas (que representan las relaciones que se establecen entre las distintas entidades biológicas) que conectan dichos nodos. El conjunto de aristas puede ser: ordenado (grafo dirigido) o no ordenado (grafo no dirigido) (**Figura 8**).

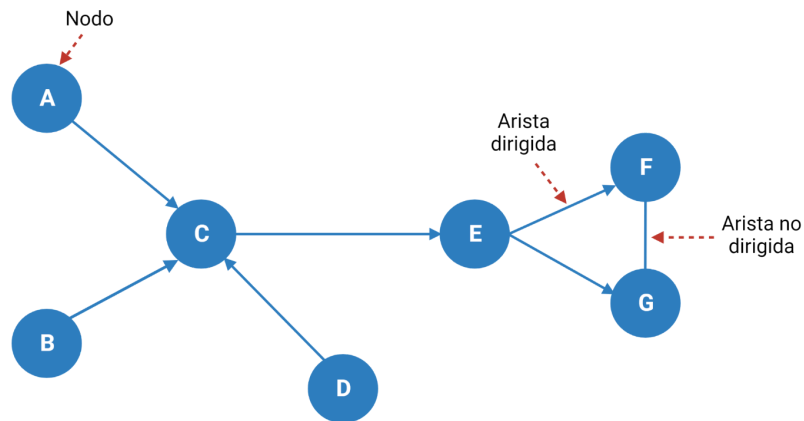


Figura 8. Componentes básicos de una red. Se muestran los componentes más importantes de una red molecular. Los círculos representan entidades biológicas (nodos) y las aristas relaciones entre los mismos. Las relaciones pueden ser dirigidas (flechas) o no dirigidas (línea continua).

4.2. Tipos de redes biológicas

Es conocido el hecho de que la complejidad subyacente a la biología está dando paso al estudio de la misma desde una perspectiva holística, sustituyendo al método reduccionista que se había venido utilizando históricamente hasta hace unas pocas décadas. Con el desarrollo de diferentes técnicas moleculares y la generación de datos *ómicos*, muchas disciplinas han optado por el empleo de redes moleculares a la hora de estudiar la relación entre diferentes componentes biológicos (biología de sistemas). Existen, por tanto, tantas redes biológicas como relaciones entre diferentes entidades biológicas (enfermedades, fármacos, genes, proteínas, metabolitos, etc).

Unas de las redes más empleadas para el estudio de enfermedades complejas son las **redes de regulación**. Se basan en estudiar las relaciones entre los factores de transcripción y los genes, con el fin de modelar e identificar alteraciones en los procesos reguladores que dan lugar a la aparición o desarrollo de una determinada enfermedad (Kerlebach & Shamir, 2008). En estos casos, los nodos de la red representan factores de transcripción y genes, y las aristas las interacciones entre estos.

Otro tipo de redes biológicas empleadas son las **redes de coexpresión**. Éstas se construyen mediante la conexión de pares de genes que presentan una alta correlación en sus perfiles de expresión génica. En este contexto, las redes de coexpresión de genes permiten agrupar conjuntos de genes con patrones de expresión similar bajo unas condiciones

determinadas. De este modo, este tipo de redes permite refinar el estudio funcional de grupos de genes dentro de un contexto biológico concreto (Gupta & Pereira, 2019). Los nodos de representan los genes, mientras que las aristas (ponderadas) representan los valores de correlación de expresión entre pares de genes.

Las **redes metabólicas y de señalización** aportan información acerca de las reacciones enzimáticas y metabólicas que ocurren en el interior de la célula. En estas redes los nodos representan enzimas y las aristas que conectan los pares de enzimas representan metabolitos de una reacción enzimática que conecta una enzima con otra. Representan el conjunto de reacciones bioquímicas que se producen en el interior celular y se emplean para predecir biomarcadores para enfermedades complejas (Angione, 2019).

Otros tipos de redes empleadas en la actualidad son las **redes de similitud**. Éstas conectan dos nodos (entidades biológicas) en función de la similitud entre ambos. Un ejemplo son las redes de similitud química entre fármacos o proteínas. Han sido empleadas con bastante eficacia para predecir interacciones entre fármacos o para reposicionamiento de fármacos (Azad et al., 2021; Vilar et al., 2014; Zhou et al., 2015). El principio de este tipo de redes consiste en que, por ejemplo, si dos fármacos tienen una similitud estructural alta, también tienen mayor probabilidad de interactuar entre sí. Han sido empleadas como métodos de predicción para reposicionamiento de fármacos, efectos secundarios o dianas moleculares (Brouwers et al., 2011; Campillos et al., 2008; Lounkine et al., 2012).

Uno de los tipos de redes más ampliamente estudiado en el campo de la medicina son las redes de **interacción proteína-proteína (IPP)**. La presente Tesis centrará su metodología en este tipo de redes biológicas, las cuales se describirán con detalle en el siguiente apartado.

4.2.1. Redes de interacción proteína-proteína (IPP) y el Interactoma Humano

Las redes de IPP representan interacciones físicas (aristas) entre proteínas (nodos). La integración de estas redes con datos genómicos, transcriptómicos y proteómicos permite estudiar las funciones celulares en la mayoría de contextos fisiológicos o patológicos (Luck et al., 2020). De manera análoga a la secuenciación del genoma humano, la generación del Interactoma Humano es necesaria para el estudio imparcial de los mecanismos biológicos a nivel proteómico en un contexto celular. La estructura y naturaleza de las redes de IPP han

sido objeto de estudio por parte de disciplinas como la biología de sistemas debido a los grandes conjuntos de datos (*datasets*) disponibles (Safari-Alighiarloo et al., 2014). El análisis sistemático de las redes de IPP se inició a mediados de la década de los 90, con estudios que buscaban la relación entre grandes complejos proteicos (Bartel et al., 1996). Posteriormente, la creciente evidencia de que existen interacciones entre diferentes vías de señalización celular ha demostrado que la transducción de señales se produce a través de una red de vías interconectadas, y no a través de una serie de rutas celulares aisladas (Shuai, 2000). Por ello, actualmente se está prestando gran atención a este tipo de información, al mismo tiempo que se están generando gran cantidad de *datasets* para estudios a gran escala.

Existen diferentes métodos de obtención de redes de IPP, pudiendo distinguir entre los computacionales y los experimentales. Con los avances computacionales y el desarrollo de las tecnologías *ómicas*, se han desarrollado métodos de predicción de interacción entre proteínas. Estos métodos emplean el contexto estructural, genómico y biológico de las proteínas y genes para predecir IPP (Skrabanek et al., 2008). Una de las ventajas del uso de redes de IPP derivadas de métodos computacionales es el bajo costo y el poco tiempo necesario para generar este tipo de redes. No obstante, su principal limitación es que la precisión de los resultados obtenidos mediante predicción depende en gran medida del enfoque computacional empleado. Además, no existe un *gold standard* para su generación por medio de métodos computacionales, ya que un método que funciona bien para predecir una IPP podría funcionar mal para predecir otra, al generar falsos positivos y falsos negativos (El et al., 2015). Es por ello que la interpretación de los resultados obtenidos mediante el análisis de estas redes debe realizarse con cautela. Por otro lado, los métodos experimentales para la detección de IPP, ofrecen la ventaja de proporcionar información sobre las interacciones reales que se producen entre proteínas en un contexto biológico, lo que proporciona una mayor confianza en los resultados obtenidos de esta forma que en los obtenidos por predicción. No obstante, una de las principales limitaciones de estas redes, en general, consiste en que, a pesar de que se están haciendo grandes esfuerzos para completarlas, todavía están parcialmente incompletas (Luck et al., 2020; Rolland et al., 2014; Rual et al., 2005; Vidal, 2016), ya que hay un cierto sesgo hacia el estudio de ciertas proteínas con mayor relevancia para la comunidad científica, como las relacionadas con cáncer u otras enfermedades más estudiadas. Sin embargo, a pesar de esta limitación, estas redes de IPP se han empleado con éxito para predecir biomarcadores para algunas enfermedades complejas o dianas terapéuticas para las mismas.

4.3. Parámetros de red

Gracias a esta teoría de grafos pueden ser diseñados modelos para todas las entidades biológicas de un sistema que presenten algún tipo de relación entre ellas. El modelado matemático de estos sistemas mediante herramientas informáticas se denomina modelo *in silico*.

Si el sistema representa moléculas y relaciones moleculares, algunos autores apuntan a que las enfermedades se producen como resultado de una perturbación en estas redes moleculares (Csermely et al., 2013; del Sol et al., 2010; Huang et al., 2009). En la misma línea, otros autores sugieren que los objetivos farmacológicos o dianas moleculares actúan distribuyendo un estímulo concreto al resto de proteínas (nodos) relacionadas en las redes de interacción proteína-proteína (Kuhn et al., 2013), por lo que conocer los diferentes parámetros de red, que evalúan la efectividad de un nodo concreto de la red para canalizar un estímulo al resto de componentes de la red, cobra cierta relevancia en el análisis de redes biológicas. A continuación, se detallan algunos de los parámetros de red más importantes para el análisis de redes biológicas:

Grado de conectividad (*degree*): el grado de conectividad o *degree*, k , es uno de los parámetros locales más estudiados y elementales en la teoría de grafos. Se refiere al número de conexiones que tiene un nodo concreto con otros nodos de la red (**Figura 9**). Es una medida local, ya que representa el grado en que un nodo determinado de la red está conectado con sus vecinos.

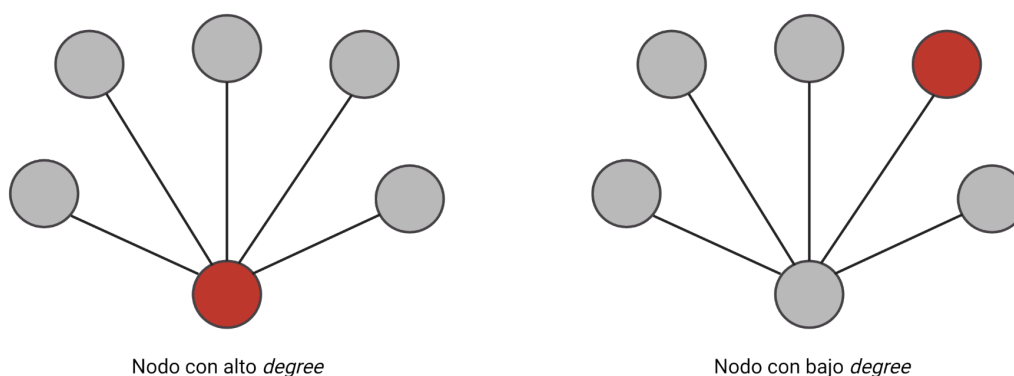


Figura 9. Parámetro topológico de red: *degree centrality*. A la izquierda se muestra un nodo (en color rojo) con alto valor de *degree centrality* ($k = 5$). A la derecha (en color rojo) se muestra otro nodo con bajo valor de *degree centrality* ($k = 1$).

Los nodos con un alto valor se denominan comúnmente como *hubs*. Estos *hubs* han sido ampliamente estudiados en el campo de la farmacología por su importancia, debido a que son capaces de transmitir la información a muchos nodos de la red (Amala & Emerson, 2019; Borneman et al., 2006; McGovern & Barreto, 2021; Nithya et al., 2023; Su et al., 2021; Viacava Follis, 2021). Además, las proteínas rara vez actúan de forma aislada, sino que más bien actúan en conjunto para dar lugar a una función molecular concreta o al desarrollo de una enfermedad compleja (excepto en las enfermedades monogénicas). De hecho, se ha observado que, a mayor grado de aglomeración de las proteínas, mayor probabilidad hay de que éstas tengan un alto grado de similitud en cuanto a funciones biológicas compartidas (Menche et al., 2015). Asimismo, algunos estudios sugieren que las proteínas que interaccionan físicamente con las proteínas de una determinada enfermedad en las redes de interacción proteína-proteína, presentan una mayor probabilidad (hasta diez veces más de lo esperado por azar) de estar involucradas en el desarrollo de la enfermedad (hipótesis local) (Barabási et al., 2011; Goh et al., 2007; Oti et al., 2006; Wang et al., 2011), por lo que encontrar proteínas con un alto número de conexiones con otras proteínas de la enfermedad en el Interactoma Humano podría ser una estrategia útil para considerar nuevas dianas moleculares asociadas a una enfermedad compleja concreta. Este tipo de estudios también ha logrado descubrir que existe un mayor solapamiento de las manifestaciones clínicas o síntomas de dos enfermedades cuanto mayor sea el grado de aglomeración de las proteínas de ambas enfermedades en el Interactoma Humano.

Una propiedad importante de las redes biológicas, y relacionada con el grado de conectividad, consiste en que éstas son libres de escala (*scale-free*). A diferencia de las redes aleatorias, las redes biológicas poseen la propiedad de tener unos pocos nodos con muchas relaciones con otros nodos (alto *degree centrality*) y muchos nodos con pocas relaciones con otros nodos de la red (**Figura 10**). En este contexto, los nodos con un bajo valor de *degree centrality* desempeñan un papel menor en la topología de la red, mientras que los nodos con un alto valor afectan significativamente a ésta (Koutrouli et al., 2020). Por ello, es uno de los parámetros evaluados para comprobar si una red se asemeja a una red biológica real o, por el contrario, se trata de una red que podría haber sido generada por azar.

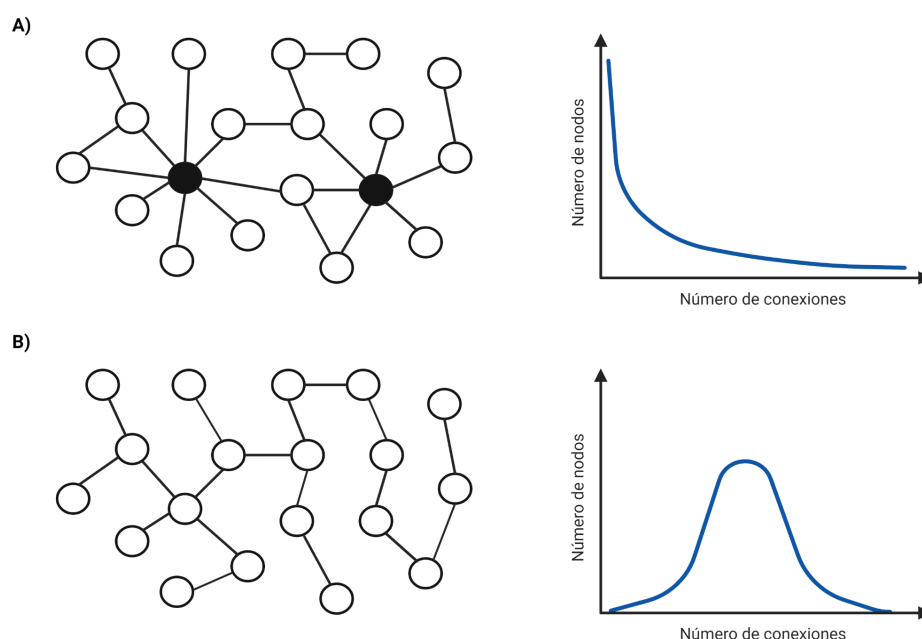


Figura 10. Propiedades de las redes biológicas. (A) Se muestra el ejemplo de cómo se organiza una red biológica (libre de escala o *scale-free*). Las redes biológicas presentan una pequeña cantidad de nodos muy conectados y una gran cantidad de nodos poco conectados. (B) Las redes aleatorias, a diferencia de las redes biológicas, no presentan la propiedad de ser libres de escala o *scale-free*, y tienen una distribución aleatoria en lo referido al número de conexiones de cada nodo de la red, que presentan aproximadamente el mismo número de conexiones que el resto de nodos de la red. Creado con BioRender.com

Betweenness centrality: La centralidad de intermediación o *betweenness centrality* (Figura 11) hace referencia a la capacidad que un nodo tiene, con respecto al resto de la red, de transmitir información al resto de nodos de la red. Su valor se estima calculando la fracción de caminos más cortos que pasan a través de un nodo determinado. Se trata, por tanto, de una medida global de la cantidad de control que un nodo ejerce con respecto al resto de la red. Los nodos con un alto valor asociado se caracterizan por funcionar como “puente” entre diferentes grupos de nodos de la red, es decir, son nodos por los que pasa gran cantidad de información transmitida por otros grupos de nodos presentes en la red, y por ello son denominados comúnmente como “cuellos de botella” (Yu et al., 2007). Por tanto, eliminar nodos con alto valor de *betweenness centrality* puede repercutir drásticamente en la estructura de la red, ya que se puede perder la conexión entre diferentes componentes de ésta, impidiendo el flujo de información entre ellos. Algunos autores han empleado este parámetro topológico para identificar elementos clave dentro de una red molecular, como fármacos o compuestos que actúan modulando diferentes rutas metabólicas, ya que nodos de la red con un alto valor asociado pueden transmitir la información a diferentes puntos de la red (Nacher

& Schwartz, 2008). De este modo, estos fármacos pueden modular dianas moleculares implicadas en procesos biológicos diferentes, por lo que en enfermedades complejas que dependen de diversos procesos biológicos alterados podrían ser una opción para revertir la patología actuando en diferentes puntos de la red (Yu et al., 2007).

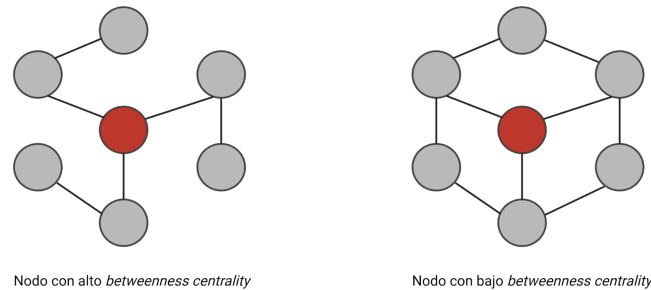


Figura 11. Parámetro topológico de red: *betweenness centrality*. A la izquierda se muestra un nodo (en color rojo) con alto valor de *betweenness centrality*. A la derecha (en color rojo) se muestra otro nodo con bajo valor de *betweenness centrality*.

Longitud de caminos más cortos (*shortest paths length*): la distancia en redes se mide por la longitud del camino, que nos indica cuántos enlaces o aristas debemos atravesar para realizar el camino de un nodo concreto de la red a otro (**Figura 12**). Como hay muchas rutas alternativas entre dos nodos, la ruta más corta es la ruta con menor número de enlaces entre los nodos de interés. Por tanto, se trata de una medida global de la “navegabilidad” general de una red. Dos nodos son adyacentes cuando poseen una arista común que los conecta.

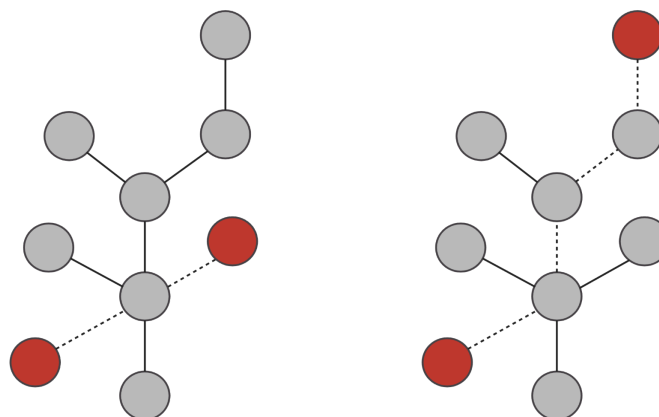


Figura 12. Parámetro topológico de red: longitud de caminos más cortos. A la izquierda se muestra una red con una longitud más corta ($n = 2$) entre dos nodos que en la red de la derecha ($n = 4$). Las líneas discontinuas representan la longitud de los caminos más cortos entre dos nodos concretos de la red (en rojo).

Este parámetro ha sido empleado en el análisis de redes moleculares para estudiar la relación entre enfermedades complejas y las comorbilidades asociadas, ya que se ha descrito que enfermedades similares a nivel fenotípico, o enfermedades con comorbilidades asociadas, están más cerca entre sí en estas redes moleculares de lo esperado por azar (Menche et al., 2015). Este tipo de estudios ha dado lugar al surgimiento de una nueva disciplina denominada medicina de redes o *network medicine* (Barabási et al., 2011). Estas aproximaciones también han sido empleadas para la predicción de la efectividad de fármacos a nivel molecular contra una determinada enfermedad compleja, ya que se ha visto que la cercanía de las dianas moleculares de un fármaco a los genes de una enfermedad concreta está directamente relacionada con la efectividad del fármaco para el tratamiento de esa enfermedad (Cheng et al., 2018; Guney et al., 2016), distinguiéndose entre fármacos paliativos y etiológicos en función de estas distancias (Yildirim et al., 2007) (**Figura 13**). Este tipo de estudios integra información sobre los genes de enfermedad, sobre los fármacos y sus dianas moleculares y el análisis de redes a fin de predecir nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades complejas, y da lugar al surgimiento de otra disciplina, actualmente en auge, denominada farmacología de sistemas.

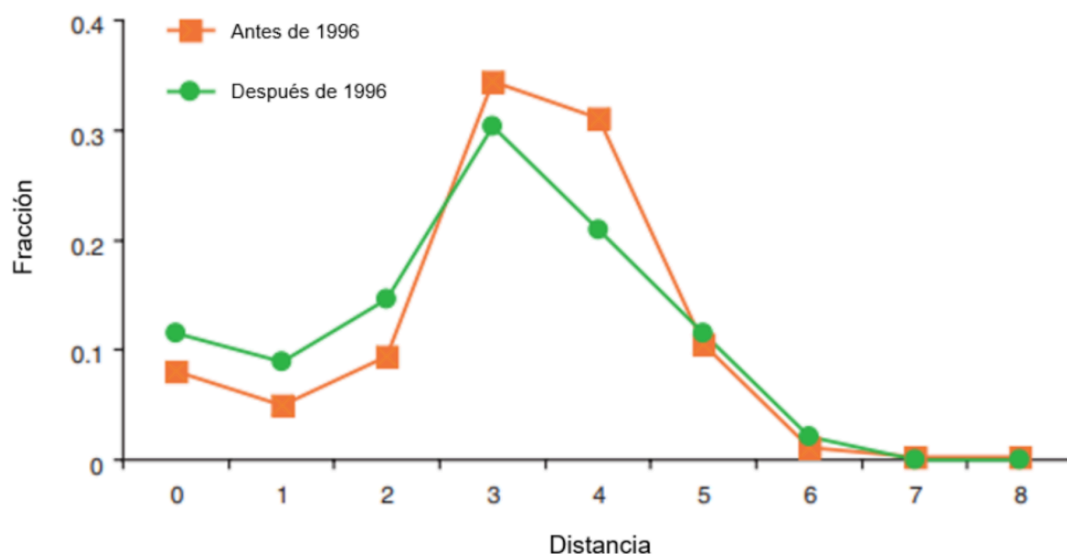


Figura 13. Gráfica comparativa de las distancias en redes moleculares entre los genes de enfermedad y las dianas moleculares. A medida que se conocen las bases moleculares de las enfermedades, se observa una mayor tendencia a desarrollar fármacos cuyas dianas moleculares se sitúan más cerca de los genes de enfermedad ($P < 0,01$. Kolmogorov-Smirnov test). Aquellos fármacos cuyas dianas están más cerca de los genes de enfermedad se consideran fármacos racionales, mientras que los que tienen dianas moleculares lejanas a los genes de enfermedad se valoran como paliativos. El eje de las Y representa la fracción del número de fármacos aprobados, y el eje de las X representa la distancia molecular entre las dianas de los fármacos y los genes de enfermedad. *Modificado de Yildirim y colaboradores (2007)*

5. Farmacología de sistemas

5.1. Definición y características de la farmacología de sistemas

La industria farmacéutica hace frente a los problemas actuales en investigación y desarrollo de medicamentos, donde el tiempo para encontrar nuevos candidatos para el tratamiento de enfermedades complejas es muy largo (aproximadamente unos 12 años) **(Figura 14)**, requiere una gran cantidad de recursos y conlleva un riesgo asociado en cuanto a cuestiones de eficacia y seguridad. En las últimas décadas se han desarrollado nuevas tecnologías y disciplinas que pueden suponer una gran ventaja para acelerar este proceso. Una de las disciplinas emergentes que pueden ser de gran utilidad en este contexto es la farmacología de sistemas.

La farmacología de sistemas es una rama de la farmacología que estudia cómo los fármacos afectan al organismo a nivel global, considerando la interacción entre diferentes sistemas biológicos. Con el desarrollo en paralelo de disciplinas como la bioinformática y el surgimiento de bases de datos que almacenan información procedente de diferentes estudios científicos y tecnologías *ómicas*, la farmacología de sistemas se nutre de estos elementos para estudiar y proponer nuevas terapias, teniendo en cuenta los diferentes elementos biológicos que intervienen en el desarrollo y tratamiento de enfermedades complejas.

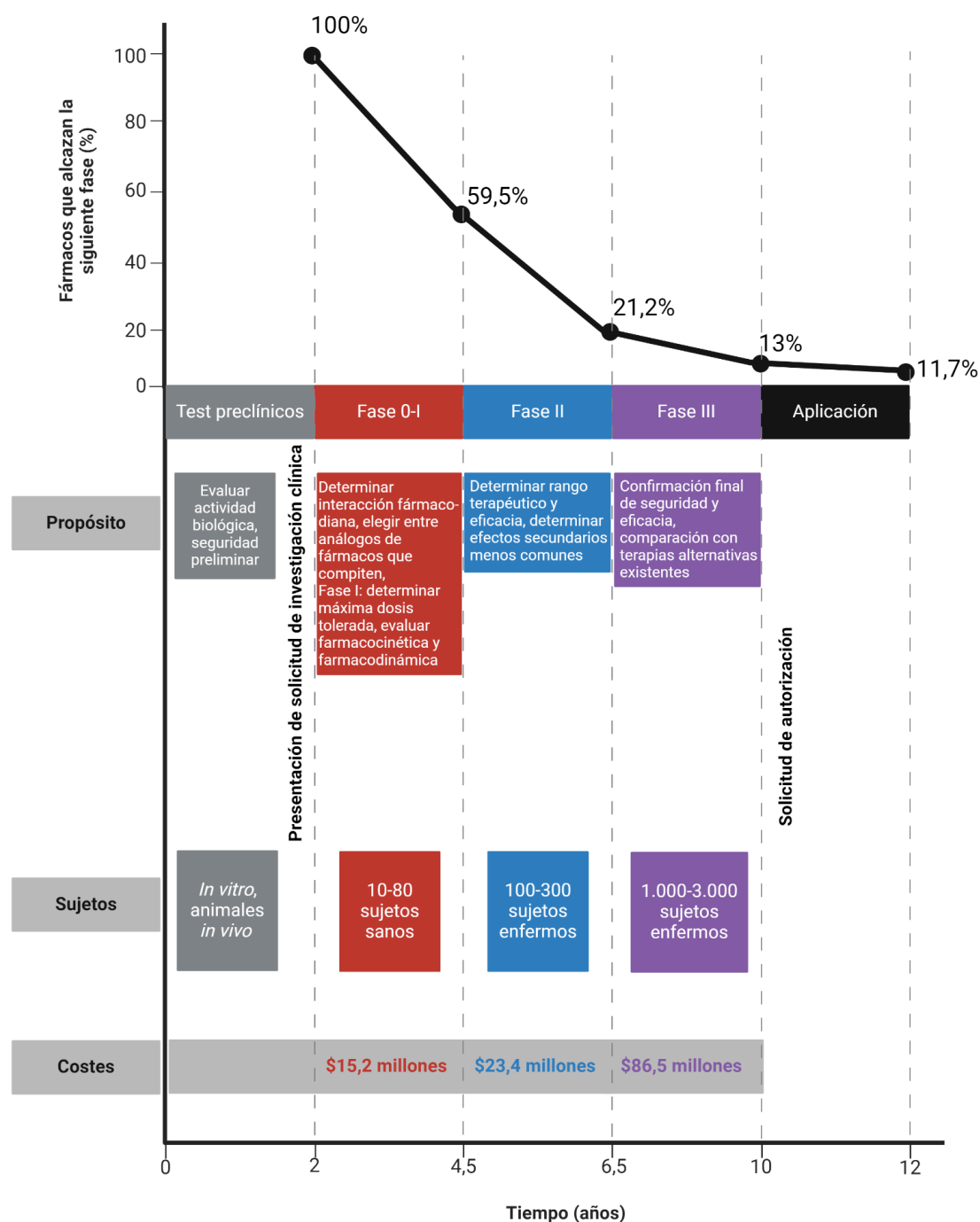


Figura 14. Tiempo, costes y éxito en las diferentes etapas de desarrollo de fármacos. Las tasas de fracaso más altas ocurren en la Fase II, primera etapa en la que la dosis del fármaco en humanos se aumenta hasta alcanzar niveles que se esperan que sean clínicamente activos. La probabilidad global de que un fármaco alcance el mercado es de alrededor de un 11%, y abarca un periodo medio de 12 años. *Modificado de Van Norman (2016). Creado con BioRender.com*

A diferencia de los métodos clásicos para la búsqueda de fármacos, como el del paradigma de las “balas mágicas” propuesto por Paul Ehrlich (Strebhardt & Ullrich, 2008), consistente en el enfoque “una enfermedad-una diana molecular-un fármaco”, la

farmacología de sistemas contempla las enfermedades complejas y su tratamiento como un sistema donde muchos elementos biológicos interaccionan entre sí, proponiendo un enfoque holístico en lugar de uno reduccionista (**Figura 15**). Con el avance de la medicina y el descubrimiento de enfermedades complejas como el cáncer, el paradigma propuesto por Ehrlich ha quedado desfasado, por lo que surge la necesidad de buscar nuevos enfoques para el tratamiento de estas enfermedades.

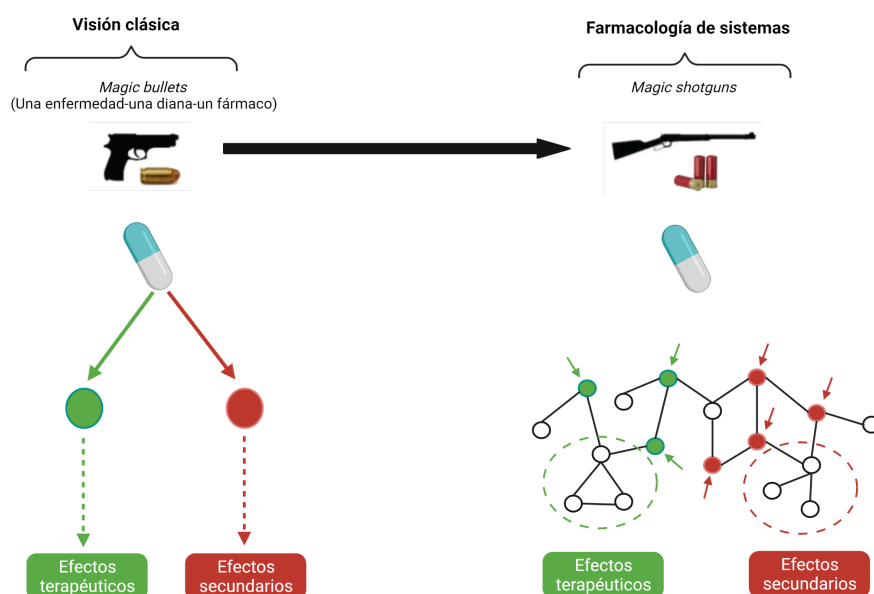


Figura 15. Visión clásica vs visión basada en farmacología de sistemas. El paradigma reduccionista de las balas mágicas (*magic bullets*) propone que un fármaco se une a una diana molecular única y esta unión da lugar a la aparición de efectos terapéuticos para tratar una enfermedad concreta y efectos secundarios. Se considera la acción del fármaco como un sistema de caja negra, donde se obvian las relaciones moleculares producidas como consecuencia de la unión del fármaco a la diana molecular. Con el descubrimiento de las enfermedades complejas surgen disciplinas, como la farmacología de sistemas, que consideran la acción de los fármacos como la interacción de estos con diferentes dianas moleculares (*magic shotguns*), que a su vez interaccionan con otras proteínas para dar lugar a efectos terapéuticos y a efectos secundarios producto de estas interacciones. Se considera como un sistema de caja blanca, ya que permite estudiar las relaciones moleculares que ocurren tras la administración de un fármaco. *Creado con BioRender.com*

Esta disciplina se encuentra actualmente en auge, debido a la ventaja que supone la integración de diferente información biológica con el fin de estudiar las enfermedades complejas y sus posibles tratamientos. Con el desarrollo de las nuevas tecnologías y el almacenamiento de información en bases de datos, los estudios relacionados con la farmacología de sistemas han ido creciendo de manera exponencial (**Figura 16**).

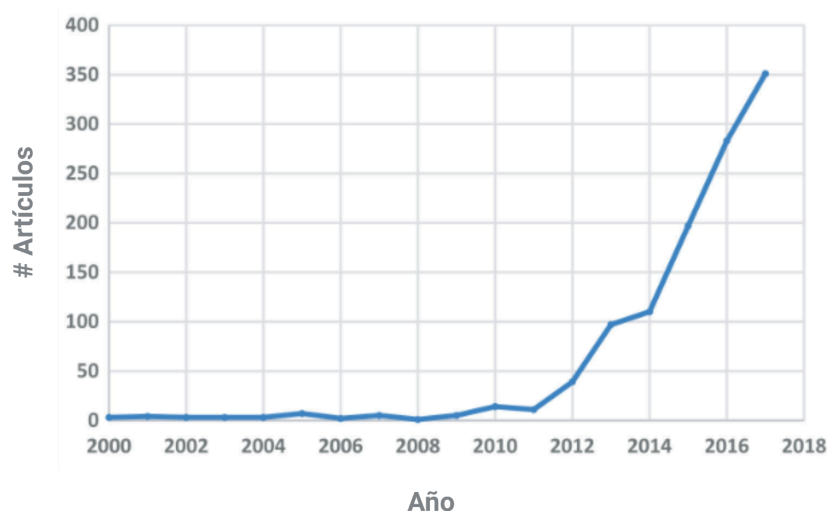


Figura 16. Publicaciones científicas relacionadas con la farmacología de sistemas. Se muestra el número de artículos científicos donde su *abstract* menciona el término “farmacología de sistemas” y los años correspondientes, desde el 2000 hasta el 2018. Con el desarrollo de las nuevas tecnologías ómicas y bases de datos, la farmacología de sistemas ha experimentado una creciente importancia con el paso de los años. *Modificado de Cucurull-Sanchez y colaboradores (2019)*

Entre las aplicaciones relacionadas con el ámbito de la farmacología y la medicina, existen tantas como datos disponibles para cada entidad biológica (fármacos, proteínas, efectos secundarios o enfermedades, por nombrar algunas). Así, la farmacología de sistemas puede ser de gran utilidad para:

- Descubrimiento de nuevos fármacos
- Predicción de resistencia a medicamentos
- Predicción de efectos secundarios
- Predicción farmacocinética y farmacodinámica de fármacos

Una aplicación interesante en este contexto, y en la que se centrará la presente Tesis, es la del **reposicionamiento de fármacos**.

5.2. Estrategias de reposicionamiento de fármacos mediante farmacología de sistemas

El reposicionamiento de fármacos es un método potente que podría ayudar al descubrimiento de nuevas indicaciones para un fármaco ya aprobado para el tratamiento de una enfermedad diferente para la que está indicado. Existen ejemplos de reposicionamiento de fármacos con éxito, en los que el fármaco propuesto mejora la eficacia de los fármacos ya existentes para el tratamiento de la enfermedad. Los primeros ejemplos de reposicionamiento de fármacos fueron debidos a una casualidad (serendipia). No obstante, con el avance de los nuevos métodos computacionales y la información existente en las bases de datos, se allana el camino para el abordaje, desde un punto de vista racional, de este tipo de enfoques. De la mano de la ya mencionada farmacología de sistemas, los estudios relacionados con el reposicionamiento de fármacos han ido aumentando con el paso de los años (**Figura 17**), debido a que ofrecen una alternativa al desarrollo de otros nuevos, lo que podría suponer un ahorro de tiempo y recursos para la industria farmacéutica y un beneficio evidente para los pacientes.

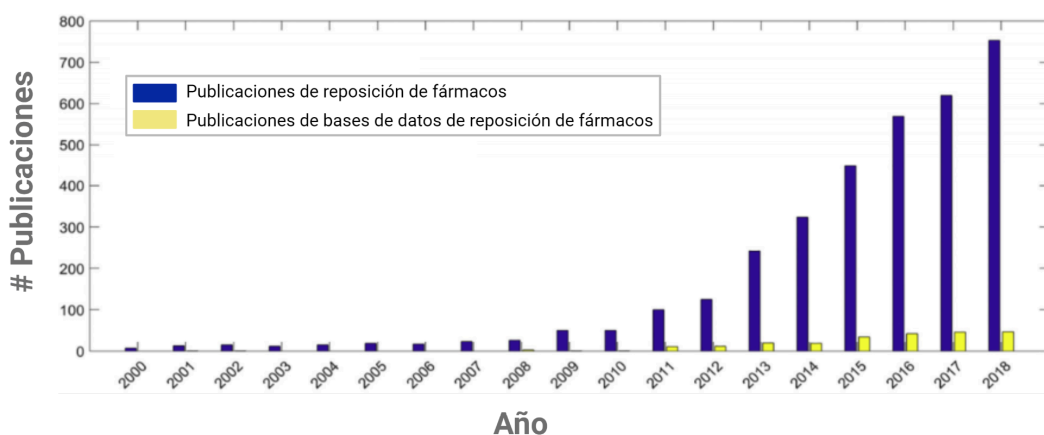


Figura 17. Número de publicaciones científicas relacionadas con el reposicionamiento de fármacos y bases de datos de reposicionamiento de fármacos. Se muestran el número de publicaciones científicas de reposicionamiento de fármacos y bases de datos relacionadas desde el año 2000 hasta el 2018. Se observa un aumento exponencial con el paso de los años. *Modificado de Masoudi-Sobhanzadeh y colaboradores (2020)*

Existen diferentes enfoques para la investigación de la reposicionamiento de fármacos basados en la farmacología de sistemas (Parvathaneni et al., 2019; Turanli et al., 2021):

- **Basados en firmas de expresión génica:** Este tipo de métodos se basa en comparar la firma de expresión génica de una determinada enfermedad con el perfil de expresión génica de un fármaco en diferentes líneas celulares tras su administración, con el fin

de encontrar uno que revierta el perfil de expresión de la enfermedad. Este tipo de estudios ha dado lugar a la creación de un proyecto internacional, CMap (www.broadinstitute.org/connectivity-map-cmap), cuya misión es recopilar información de expresión génica de enfermedades y de fármacos en diferentes líneas celulares, con el fin de buscar nuevos tratamientos para enfermedades complejas.

Una de las limitaciones que tiene este tipo de aproximaciones es el tiempo necesario y los recursos de laboratorio y computacionales necesarios para llevarlas a cabo. No obstante, tienen múltiples ventajas, al ser eficaces en la construcción de mapas detallados de conexiones entre enfermedades y el modo de acción de los medicamentos, además de ser fáciles de validar mediante estudios preclínicos y clínicos, debido a la baja tasa de falsos positivos en comparación con otros métodos computacionales.

- **Basados en redes moleculares:** Este tipo de métodos proporciona una visión integrativa de las relaciones, tanto cualitativas como cuantitativas, que se dan en un sistema biológico. A pesar de que el modelado de redes en farmacología se encuentra en sus inicios, ya han sido muchos los estudios que han empleado este tipo de enfoques para predecir dianas moleculares, interacciones entre fármacos, efectos secundarios o nuevas indicaciones para enfermedades complejas.

Algunos ejemplos del empleo con éxito del modelado de redes biológicas basados en la farmacología de sistemas son la reposición de fármacos para el tratamiento de cánceres diversos (Turanli et al., 2021), ya que es la enfermedad compleja más estudiada en la actualidad, así como el de otras enfermedades complejas como la diabetes (Saiti et al., 2023), por citar algunas.

5.3. Farmacología de sistemas para el estudio de la efectividad y seguridad farmacológica

Los estudios preclínicos y clínicos para evaluar la eficacia de los fármacos son procesos laboriosos y que consumen una gran cantidad de tiempo y de recursos. Por ello, los estudios de predicción *in silico* (mediante métodos computacionales) ofrecen una alternativa muy demandada en la actualidad por la industria farmacéutica. Este tipo de estudios puede

suponer la ventaja de priorizar aquellos fármacos que tienen más probabilidad de ser efectivos y enfocar los estudios en estos, descartando aquellos que no tienen evidencia a nivel molecular para el tratamiento de una determinada enfermedad.

5.3.1. Parámetros de red aplicados a la priorización de fármacos efectivos

Como se ha detallado anteriormente, existen cada vez más herramientas para llevar a cabo este tipo de estudios. Sin embargo, la presente Tesis Doctoral se centrará en el uso de redes biológicas para evaluar las relaciones moleculares entre los fármacos aprobados en el mercado y las dianas moleculares de la enfermedad, con el fin de predecir si presentan una alta evidencia de ser candidatos para su tratamiento. En este contexto, existen determinados parámetros de red que determinan la importancia de un nodo dentro de la misma. Tal y como se detalla en el **apartado 4.3**, algunos de los parámetros de red más estudiados en la actualidad son el *degree centrality* y el *betweenness centrality*, valores que indican la importancia tanto a nivel local (*degree centrality*) como a nivel global (*betweenness centrality*) de un nodo en la red. Para dar contexto al análisis de este tipo de estudios, en primer lugar es necesario construir la red de enfermedad a partir del Interactoma Humano, con el fin de modelar la fisiopatología de la misma. Posteriormente, el análisis de esta red molecular será el que arroje luz sobre los posibles tratamientos más efectivos en función de los parámetros de red antes mencionados.

Las distancias en el Interactoma Humano entre las dianas moleculares y los genes de una determinada enfermedad también han sido empleados para evaluar la eficacia de los fármacos, distinguiendo entre fármacos paliativos, cuyas distancias están más lejos en el Interactoma de lo esperado por azar, y fármacos racionales, aquellos cuyas dianas moleculares están más próximos a los genes de enfermedad de lo esperado por azar.

5.3.2. Polifarmacología y promiscuidad de fármacos

Además de los parámetros mencionados anteriormente, la promiscuidad de los fármacos es una característica que podría ser de gran utilidad en el tratamiento de enfermedades complejas como la endometriosis. Fármacos con muchas dianas moleculares relacionadas con la enfermedad son más probables que puedan ser efectivos que aquellos con una o unas pocas dianas moleculares. Es por ello que la priorización de fármacos con muchas

dianas moleculares relacionadas con la enfermedad, y el que sus dianas moleculares tengan una alta repercusión en la red de enfermedad, podría ser de gran utilidad para reposicionar fármacos empleados en otras enfermedades y cuyos perfiles de efectos secundarios ya son bien conocidos.

En las últimas décadas, los avances en medicina de redes (*network medicine*) han permitido asentar las bases para un enfoque polifarmacológico. Existen diferentes opciones para obtener un resultado clínico deseado en el que se desea intervenir una enfermedad compleja y poligénica bajo este tipo de aproximaciones. La polifarmacología puede surgir de un sólo compuesto que se una a múltiples dianas moleculares (fármacos promiscuos) o de varios compuestos que, en combinación, modulen diferentes dianas terapéuticas, obteniendo un efecto sinérgico. En principio, ambas opciones serían igualmente viables para el manejo de enfermedades complejas. De hecho, las dos han sido empleadas recientemente por la industria para el tratamiento de enfermedades como cáncer (Morphy, 2010) o enfermedades neurológicas (Millan, 2006; Youdim & Buccafusco, 2005). Sin embargo, existen algunas ligeras diferencias en las consecuencias que podrían producir en el paciente. La combinación de fármacos, a diferencia de aquellos administrados de manera individual, puede dar lugar a interacciones entre los medicamentos co-administrados, produciéndose una variabilidad en la eficacia farmacológica o la posible aparición de efectos adversos indeseados (Jankel & Fitterman, 1993). Además, es conocido el hecho de que, cada vez más, las personas toman otros medicamentos para el tratamiento de otras enfermedades diferentes, situación que incrementa el riesgo de interacciones farmacológicas. Otra pequeña ventaja inherente a los fármacos promiscuos con respecto a la combinación de fármacos es la simplificación del régimen terapéutico para el paciente (Prati et al., 2014). Por ello, los fármacos promiscuos (*multi-target*) se están convirtiendo en la actualidad en una alternativa bastante considerada para el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de enfermedades complejas (L. Bolognesi, 2013; Mencher & Wang, 2005).

5.3.3. Farmacogenética y farmacogenómica

Las variantes genéticas en determinados genes relacionados con la respuesta a fármacos, genes ADME (Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción), también pueden traer como consecuencia una variabilidad en la eficacia de los medicamentos. Además, estas variantes también pueden dar lugar a un metabolismo deficiente del fármaco,

produciendo su acumulación en el organismo y dando lugar a la aparición de efectos secundarios (Yip et al., 2015).

La farmacogenética es la disciplina que surgió como resultado del estudio de genes individuales relacionados con la respuesta a fármacos. Más tarde, al igual que en las enfermedades complejas, muchos estudios sugirieron que la respuesta a fármacos era multifactorial y estaba determinada por la acción de varios genes, surgiendo así la farmacogenómica (Kalow, 2006). Debido a la importancia del efecto de estas variantes genéticas en la respuesta a fármacos, cada día se hace más evidente la utilidad de estas disciplinas para la implementación de una medicina personalizada. A pesar de la dificultad de llevar a cabo este tipo de estudios a nivel poblacional, es evidente que se deben seguir haciendo esfuerzos para obtener más resultados que puedan aplicarse en la rutina clínica.

5.4. Bases de datos para la integración de datos ómicos

En la actualidad existen una gran cantidad de bases de datos de gran utilidad para el estudio de diferentes condiciones o entidades biológicas, que permiten realizar estudios basados en farmacología de sistemas, dependiendo del objetivo planteado. La integración de información de diferentes bases de datos permite a su vez el estudio entre los diferentes componentes de un sistema complejo, con lo cual podemos tener una visión global acerca de una cuestión o hipótesis concreta de la investigación. En la **Tabla 2** se muestran algunas de las bases de datos más empleadas en este tipo de estudios en función de los datos disponibles.

Tabla 2. Bases de datos de utilidad para realizar estudios de reposicionamiento de fármacos. Se muestra el tipo de información que contiene cada base de datos, el nombre de la base de datos, la página web y la referencia bibliográfica. *Modificado de Turanli y colaboradores (2021)*

Tipo de datos	Base de datos	Web	Referencia
Dianas moleculares	BioGRID	thebiogrid.org	(Stark et al., 2006)
	PDB	rcsb.org	(Berman et al., 2000)
	Human Protein Atlas	proteinatlas.org	(Uhlén et al., 2015)
	PubChem	pubchem.ncbi.nlm.nih.gov	(Y. Wang et al., 2009)

Fármacos	PharmGKB	pharmgkb.org	(Hewett et al., 2002)
	ChEMBL	ebi.ac.uk/chembl	(Gaulton et al., 2017)
	DGIdb	dgidb.org	(Cotto et al., 2018)
Enfermedades	GEO	ncbi.nlm.nih.gov/geo	(Barrett et al., 2013)
	OMIM	omim.org	(Hamosh et al., 2005)
	PheGenI	ncbi.nlm.nih.gov/gap/phegeni	(Ramos et al., 2014)
	GWAS Catalog	ebi.ac.uk/gwas	(Buniello et al., 2019)
	GWAS Central	gwascentral.org	(Beck et al., 2014)
	HGMD	hgmd.cf.ac.uk	(Stenson et al., 2020)
Fármaco-diana	DrugBank	go.drugbank.com	(Wishart et al., 2018)
	BindingDB	bindingdb.org	(Liu et al., 2007)
	STITCH	stitch.embl.de	(Szklarczyk et al., 2016)
Fármaco-enfermedad	CTD	ctdbase.org	(Davis et al., 2019)
	KEGG DRUG	genome.jp/kegg/drug	(Kanehisa et al., 2017)
Efectos secundarios	SIDER	sideeffects.embl.de	(Kuhn et al., 2016)
	FAERS	fda.gov/drugs/surveillance/questions-and-answers-fdas-adverse-event-reporting-system-faers	(Fang et al., 2014)
	ADReCS-Target	bioinf.xmu.edu.cn/ADReCS-Target	(L.-H. Huang et al., 2018)
Fármaco-expresión génica	cMAP	broadinstitute.org/con	(Lamb et al.,

		nectivity-map-cmap	2006)
	ArrayExpress	ebi.ac.uk/biostudies/arrayexpress	(Parkinson et al., 2007)
Redes moleculares	KEGG	genome.jp/kegg	(Kanehisa et al., 2017)
	Reactome	reactome.org	(Croft et al., 2011)
	MANTRA	mantra.tigem.it	(Iorio et al., 2010)
	Interactome Database	interactome-atlas.org	(Luck et al., 2020)
	STRING	string-db.org	(Szkłarczyk et al., 2023)

En lo referente a la información acerca de los fármacos y sus dianas moleculares, la base de datos de DrugBank es un referente en el campo de la investigación. Es actualizada constantemente y proporciona información experimental, tanto de fármacos ya aprobados como de aquellos que están en fase de investigación. Además, contiene información acerca de las interacciones entre fármacos, lo cuál podría ser de utilidad para plantear combinaciones de terapias en las que se eviten estas interacciones que podrían afectar a la eficacia y seguridad de los fármacos. En este contexto, la base de datos de PharmGKB también ofrece información acerca de las variantes farmacogenéticas que pueden comprometer la eficacia y seguridad de los fármacos administrados. En función de los objetivos del estudio, la información presente en estas bases de datos puede ser integrada para aportar una nueva visión con respecto a los métodos experimentales clásicos.

6. Hipótesis dirigida por datos

El método científico clásico se ha basado en formular una hipótesis que posteriormente se contrasta mediante experimentación. En estos casos, los experimentos generan una serie de datos que pueden analizarse por diversos medios para probar (o refutar) la hipótesis planteada inicialmente. El principal escollo de este tipo de aproximaciones es que el investigador debe “adivinar” o predecir un factor que podría estar influyendo y tratar de analizarlo. Consecuentemente, esta metodología está limitada desde el mismo planteamiento inicial, en el sentido de que el investigador aborda el estudio con sus inherentes limitaciones de conocimiento *a priori* y sesgo experimental, simplificando sobremedida el problema y analizando uno o unos pocos factores de los cientos que podrían estar afectando. Se trata, por tanto, de un enfoque *top-down* (**Figura 18**), en el que se intenta dar solución a un problema mediante la derivación de los principios o leyes que ya son conocidos y que mejor unifican el conocimiento científico presente.

Por el contrario, las nuevas tecnologías *ómicas* permiten generar cantidades masivas de datos rápidamente, y, por lo tanto, abordar el problema de un modo menos sesgado. Tal cantidad de datos favorece la extracción y el análisis de los mismos de manera objetiva. Algunos investigadores críticos con este tipo de enfoques (*bottom-up*) argumentan que no están basados en una “hipótesis concreta”. No obstante, podría decirse que se trata de una hipótesis “amplia” o “genérica”. Al emplear este tipo de enfoques (hipótesis dirigida por datos), el análisis de estos grandes conjuntos de datos o *datasets* puede dar lugar a la generación de patrones o pistas útiles para futuros estudios de validación experimental, los cuales podrían regirse por el método tradicional basado en hipótesis del tipo: el “biomarcador X” influye en la “condición Y”. Esta combinación de recopilación de datos y posterior validación experimental podría ser el único modo de comprender las enfermedades complejas y poligénicas como la endometriosis, en la que influyen una gran cantidad de factores. En este contexto, disciplinas como la farmacología de sistemas ofrecen una oportunidad para desarrollar enfoques basados en hipótesis dirigida por los datos, ya que permiten recopilar información a gran escala sobre los fármacos y sus dianas moleculares e información sobre los mecanismos moleculares de enfermedades complejas para priorizar fármacos susceptibles de ser empleados en el tratamiento de tales enfermedades y que pueden ser validados experimentalmente en un proceso posterior.

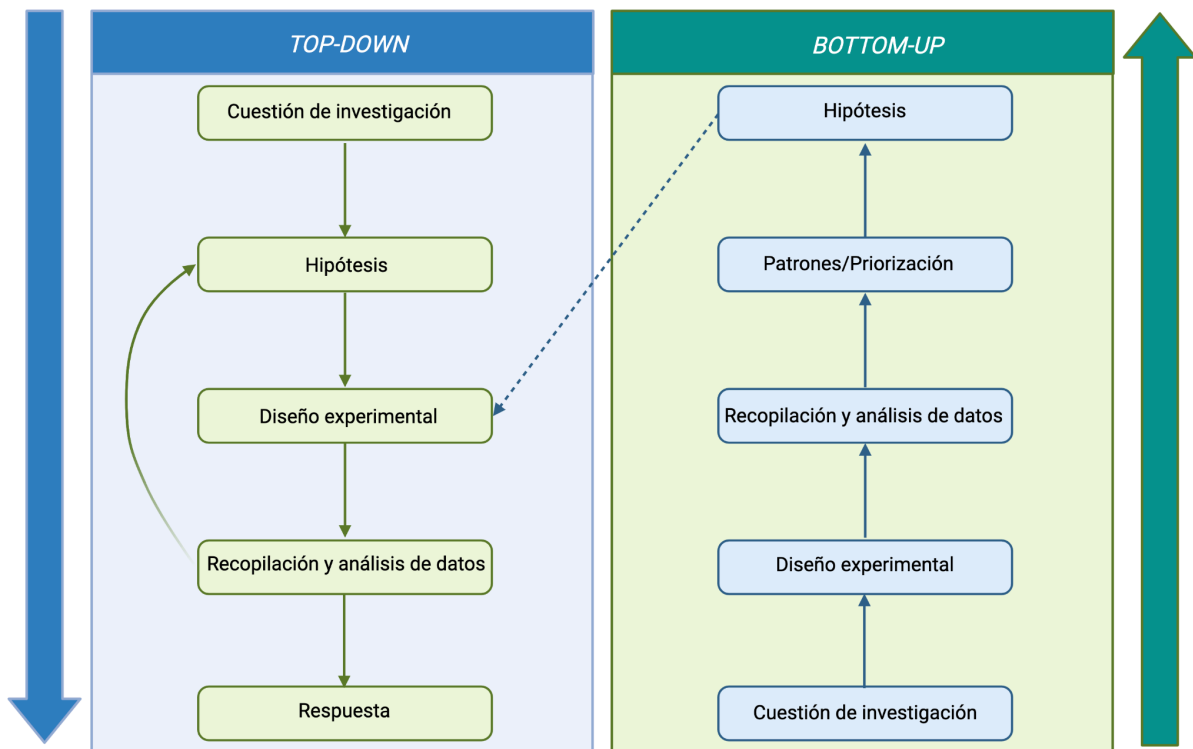


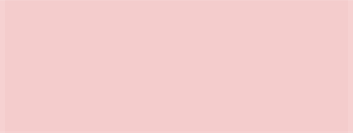
Figura 18. Esquema de los diferentes tipos de aproximaciones empleados para realizar estudios científicos. Los métodos tradicionales (*top-down*) parten de una cuestión o problema de investigación para, posteriormente, generar una hipótesis que pueda explicar ese problema. Tras realizar un diseño experimental, se extraen los datos procedentes del experimento y se analizan para dar una respuesta a la cuestión planteada inicialmente. Por otro lado, los métodos basados en enfoques *bottom-up* también parten de una cuestión de investigación, pero en este caso se realiza un diseño experimental que permita extraer y analizar diferentes tipos de datos para hallar patrones o priorizar información relevante, lo que da lugar a la generación de una hipótesis dirigida por los datos que posteriormente puede ser validada experimentalmente mediante los métodos clásicos.

Creado con BioRender.com

Hipótesis y objetivos

“En algún lugar algo increíble está esperando ser descubierto.”

- *Carl Sagan*



Durante las últimas décadas se ha generado una gran cantidad de conocimiento acerca de la etiopatogénesis de la endometriosis a nivel molecular. Sin embargo, poco se ha avanzado en las terapias adecuadas para esta enfermedad compleja y poligénica, que siguen siendo prácticamente paliativas y con una gran cantidad de efectos secundarios. A pesar de su carácter complejo y poligénico, la mayoría de las terapias actuales están enfocadas en la supresión de una o de unas pocas condiciones relacionadas con la enfermedad, pudiendo sólo paliar algunos de los síntomas relacionados con la endometriosis. La mayoría de estos tratamientos se basan en el bloqueo de la generación de estrógenos o en el bloqueo del eje hipotálamo-hipofisario-ovárico que suprime la ovulación, situación que compromete la posibilidad de embarazo natural en las pacientes. Como alternativa, se prescriben antiinflamatorios no esteroideos dirigidos a paliar los síntomas relacionados con el desarrollo y la progresión de la enfermedad.

La farmacología de sistemas y el modelado de redes moleculares podría ser una alternativa muy interesante para plantear hipótesis sobre qué fármacos podrían ser mejores candidatos que los actuales para el tratamiento de la endometriosis, bajo un enfoque que contemple la complejidad de la enfermedad a nivel molecular. Asimismo, el reposicionamiento de fármacos ya empleados para otras enfermedades, y con un perfil de efectos secundarios definido, ha cobrado importancia en los últimos años, debido al ahorro de costes y tiempo que puede suponer con respecto al desarrollo de nuevos medicamentos. En este contexto, en la actualidad existen multitud de bases de datos que almacenan información biológica procedente de diferentes estudios y métodos experimentales, y que pueden ser aprovechadas para integrar dicha información con el fin de generar hipótesis, en función de los objetivos del estudio, de un modo racional. En este contexto, la **hipótesis principal** de la presente Tesis Doctoral es que existen fármacos más efectivos a nivel molecular que los actuales para el tratamiento de la endometriosis.

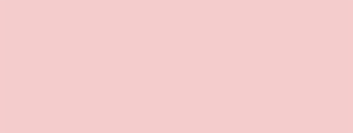
Por tanto, el **objetivo principal** es desarrollar un modelo *in silico* basado en farmacología de sistemas y análisis de redes moleculares que nos ayude a priorizar potenciales dianas terapéuticas y fármacos más efectivos para el reposicionamiento en el tratamiento de la endometriosis y/o la infertilidad asociada. Para alcanzar el objetivo principal, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Selección de genes relacionados con la endometriosis, tanto con el componente genético (estudios GWAS), como con el componente ambiental, y el estudio de su efecto en el desarrollo y progresión de la enfermedad y la infertilidad asociada (estudios de expresión génica).
2. Construcción del Interactoma Humano para modelar molecularmente la endometriosis en función de las interacciones físicas entre proteínas.
3. Análisis de las relaciones moleculares entre los genes de endometriosis en el Interactoma Humano y construcción de la red molecular de endometriosis.
4. Priorización de potenciales dianas moleculares y fármacos en función de parámetros de red.
5. Análisis y comparación de la efectividad a nivel molecular de los fármacos actuales con los potenciales fármacos priorizados para el tratamiento de la endometriosis y la infertilidad asociada.
6. Validación en la literatura de los potenciales fármacos priorizados para el tratamiento de la endometriosis y la infertilidad asociada.
7. Análisis de la seguridad de los fármacos priorizados mediante el estudio de los efectos secundarios, interacciones entre fármacos y variantes farmacogenéticas que pueden afectar a la efectividad y/o provocar toxicidad.
8. Validación *in vitro* de la eficacia de los compuestos priorizados en una línea celular de endometriosis.

Material y métodos

“La ciencia es la progresiva aproximación del hombre al mundo real.”

- *Max Planck*



1. Diseño experimental

El diseño experimental de la presente tesis doctoral se detalla en la **Figura 19** y **Figura Suplementaria 1**. Brevemente, en primer lugar, se priorizaron los genes de enfermedad, que posteriormente fueron mapeados en el Interactoma Humano para construir la red de endometriosis. Sobre esta red se priorizaron dianas moleculares y potenciales fármacos para su reposicionamiento en endometriosis, mediante el análisis de diversos parámetros topológicos de red. Para estos compuestos priorizados se llevó a cabo un análisis de seguridad en el que se analizaron los efectos secundarios, las interacciones fármaco-fármaco y las variantes farmacogenómicas. Finalmente, se llevó a cabo una revisión en la literatura con el fin de validar los resultados obtenidos mediante el modelo de priorización basado en farmacología de sistemas, y aquellos compuestos con menos efectos secundarios fueron seleccionados para una posterior validación experimental *in vitro*. En los siguientes apartados se detallarán cada uno de los pasos seguidos en el desarrollo de este modelo de priorización de fármacos para su reposicionamiento en endometriosis.

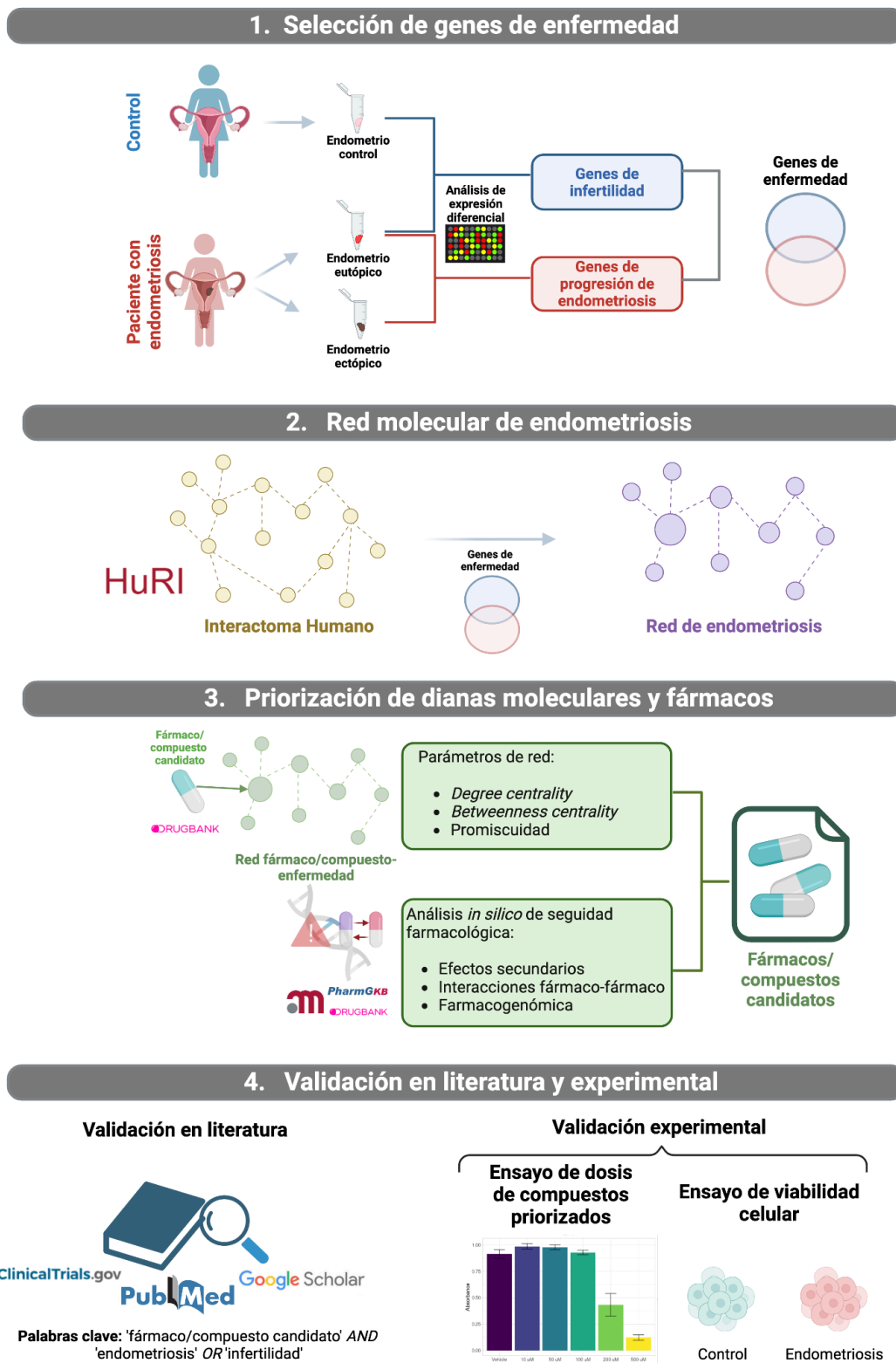


Figura 19. Esquema del diseño experimental. Representación esquemática del diseño experimental en la que se muestran, de manera secuencial, los diferentes pasos empleados en la realización del modelo de farmacología de sistemas para la priorización de dianas moleculares y potenciales fármacos o compuestos para el tratamiento de la endometriosis. *Creado con BioRender.com*

2. Construcción del Interactoma Humano

Con el fin de estudiar la relación física entre los diferentes genes/proteínas de la endometriosis para modelar la red de la enfermedad y priorizar fármacos o compuestos en función de estas relaciones, en primer lugar se procedió a elaborar el Interactoma Humano que será empleado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Este Interactoma representa todas las interacciones físicas conocidas entre proteínas humanas.

Para este propósito, se integraron dos *datasets* de IPP derivadas de dos fuentes diferentes incluídas en The Human Reference Protein Interactome Mapping Project, un proyecto relacionado con el estudio de la interacción física entre proteínas a nivel sistemático:

1) **HuRI** (Human Reference Interactome) (Luck et al., 2020): *dataset* de IPP procedentes de experimentos realizados mediante el sistema de doble híbrido de levadura y validados ortogonalmente mediante ensayos binarios que incluyen MAPPIT (*The Mammalian Protein-Protein Interaction Trap*) (Eyckerman et al., 2001), NAPPA (*Nucleic Acid Programmable Protein Array*) (Braun et al., 2009; Ramachandran et al., 2008), PCA (*Protein-fragment Complementation Assay*) (Cassonnet et al., 2011), o co-afinidad. Por tanto, estas interacciones representan una fuente fiable de información, que, a diferencia de otras, se deducen por predicción en lugar de experimentalmente. Este *dataset* procede de varios estudios que incluyen diferentes conjuntos de interacciones físicas entre proteínas (Rolland et al., 2014; Rual et al., 2005; Venkatesan et al., 2009; X. Yang et al., 2016; Yu et al., 2011) (**Figura Suplementaria 1**).

2) **Lit-BM**: *dataset* de IPP derivadas de experimentos procedentes de la literatura, las cuales han sido evidenciadas en dos o más estudios.

Para integrar la información de todos los estudios y construir el Interactoma Humano que será empleado para futuros análisis, en primer lugar se procedió a realizar la conversión de genes a identificadores únicos mediante el paquete de R biomaRt v2.30.0 (Durinck et al., 2009), el cual realiza la conversión a identificadores de Ensembl (Hubbard, 2002), una base de datos de anotación de genes. Tras realizar la conversión, se filtraron aquellas IPP duplicadas, obteniendo las IPP entre todas las proteínas humanas, y se visualizó y analizó

mediante Cytoscape v.3.8.2 (Shannon et al., 2003), un *software* de código abierto que permite integrar, visualizar y analizar redes moleculares. En este caso, se analizaron el número de proteínas únicas, el número de IPP únicas, y la propiedad *scale-free*, la cual indica si una red presenta significado biológico o por el contrario un comportamiento aleatorio (**Sección 4.3 de Introducción**) mediante el *plugin* Network Analyzer (Assenov et al., 2008).

3. Selección de genes de endometriosis e infertilidad asociada

3.1. Genes relacionados con el desarrollo y progresión de la endometriosis y la infertilidad asociada

Los estudios a nivel transcriptómico nos ofrecen una visión acerca de los genes desregulados que dan lugar a la aparición y desarrollo de la enfermedad. Debido a que es conocido el hecho de que se producen desregulaciones a nivel molecular, tanto en el tejido endometrial eutópico de mujeres con endometriosis, el propiamente dicho, como en el endometrio ectópico, el que migra fuera del endometrio, la selección de genes de endometriosis y la infertilidad asociada se centrará en ambos tejidos (**Figura 19 y Figura Suplementaria 1**).

Para llevar a cabo esta selección de genes, en primer lugar se consultó la base de datos GEO para identificar: a) estudios con muestras de endometrio ectópico y endometrio eutópico de pacientes con endometriosis, que permitirán evaluar la progresión de la enfermedad); y b) estudios con muestras de tejido eutópico de pacientes con endometriosis y tejido endometrial de mujeres sanas, con el fin de evaluar la infertilidad asociada a la endometriosis (**Figura 20 y Figura Suplementaria 1**).

En segundo lugar se realizó una búsqueda de los estudios descritos anteriormente en la base de datos y se descargaron los datos crudos para su posterior preprocesado y análisis. En este caso, se consideraron *datasets* de experimentos que cumplieran los siguientes criterios de inclusión: ARN procedente directamente de biopsia endometrial, tamaño muestral mayor de 3 en ambos grupos (caso y control), experimentos de *microarray* o RNAseq procedentes de las plataformas Affymetrix, Illumina o Agilent y datos crudos del experimento disponibles. El mismo análisis transcriptómico se realizó de manera independiente para cada estudio (*dataset*), con el fin de poder integrar diversos estudios y extraer los genes diferencialmente expresados entre las condiciones: Ectópico vs Eutópico (genes relacionados

con el desarrollo de la enfermedad) y Eutópico vs Control (genes relacionados con la infertilidad o la receptividad endometrial asociada a la endometriosis) (**Figura 20** y **Figura Suplementaria 1**). Para cada estudio se recopiló la información relacionada con el identificador de dicho estudio, el año en que se realizó, el número de muestras de cada grupo (caso y control), el estadio de la endometriosis, la fase del ciclo menstrual en el momento de la toma de la biopsia y la plataforma de *microarray* o RNAseq empleada. Estas variables se recogieron con el fin de estudiar su posible contribución a los resultados relacionados con el posterior análisis de expresión diferencial de genes y de su corrección en el caso de que los resultados se vieran influenciados por estas variables.

Una vez descargados los datos crudos de cada estudio individual, se procedió a realizar un **preprocesado** de los mismos. Para el preprocesado de los datos procedentes de estudios de *microarray* se aplicó el método RMA (*Robust Multichip Average*), implementado mediante el paquete *limma* v3.46.0 en el lenguaje de programación R (Ritchie et al., 2015). Este método corrige el ruido de fondo asociado a la técnica experimental de *microarray*. En el caso de los experimentos derivados de la tecnología RNAseq, en primer lugar se realizó un filtrado de los genes con pocos conteos mediante el paquete edgeR v3.32.1 (Robinson et al., 2010) y una transformación de los datos mediante el método Voom con *limma* v3.46.0, con el fin de hacerlos comparables con los datos provenientes de *microarrays*.

Posteriormente, se realizó una **normalización** por cuantiles con el fin de hacer comparables los datos de expresión de cada gen entre las diferentes muestras del estudio mediante *limma* v3.46.0, y se procedió a realizar la **anotación de genes** mediante el paquete de R biomaRt v2.30.0, el cual permite transformar los identificadores de las sondas (*probe sets*) a la nomenclatura del gen correspondiente.

Finalmente, para cada uno de los estudios independientes se llevó a cabo un **análisis exploratorio** de los datos mediante la visualización por PCA (*Principal Component Analysis*), con el propósito de detectar posibles datos anómalos (*outliers*) y efectos de tanda (*batch effects*) que pudieran enmascarar los resultados obtenidos en el posterior análisis de expresión diferencial. En estos PCA se estudió el efecto de algunas de las variables más importantes descritas en cada uno de los estudios independientes y que pudieran estar interfiriendo con los resultados posteriores. En este caso, se consideraron el estadio de la endometriosis (II-IV) y la fase del ciclo menstrual de la mujer en el momento de la obtención

de la biopsia endometrial, la cual se ha descrito que tiene un gran impacto en la expresión génica. De hecho, se ha comprobado que la fase del ciclo menstrual enmascara las diferencias debidas a enfermedades uterinas, y, por tanto, este efecto debe de ser corregido previamente al análisis transcriptómico (Devesa-Peiro et al., 2021). Los *outliers* fueron excluidos mediante la visualización de elipses de confianza al 99% y el efecto tanda (*batch effect*) se corrigió mediante modelos lineales utilizando el paquete *limma* v3.46.0 de R.

Una vez realizados los pasos descritos anteriormente para cada *dataset* (preprocesado, normalización, anotación de genes y análisis exploratorio), se procedió a **integrar** la información de todos los *datasets* procedentes de estudios relacionados (independientemente en las comparaciones de Ectópico vs Eutópico y Eutópico vs Control) con el fin de aumentar el tamaño muestral y de realizar un **análisis de expresión diferencial de genes (Figura 20)**. Este tipo de análisis permite comparar la media de los valores de expresión de cada gen entre diferentes muestras y provee una lista de genes con una expresión significativamente mayor o menor en una condición con respecto a otra (por ejemplo, entre tejido ectópico y tejido eutópico). Dado que este test es realizado de forma independiente para miles de genes, los P-valores obtenidos siempre han de corregirse para múltiples pruebas a fin de minimizar las tasas de falsos positivos (Benjamini & Hochberg, 1995). Este enfoque es empleado ampliamente en el campo de la medicina para obtener una mejor comprensión a nivel molecular de determinadas condiciones o enfermedades. Para llevar a cabo la integración de los *datasets*, se empleó la metodología descrita en el estudio de Tajti y colaboradores (2020) (**Figura 20**). En primer lugar, se procedió a unir la información de cada uno de los experimentos que estudian la misma condición (Ectópico vs Eutópico o Eutópico vs Control). Tras visualizar en un PCA si existía algún efecto del *dataset*, se procedió a eliminar ese efecto mediante modelos lineales con el fin de hacer los experimentos comparables entre sí y que el efecto en la expresión de los genes no se vea afectado por esta condición. Una vez corregido el efecto del experimento, se realizó un análisis de expresión diferencial de genes entre las muestras de la misma condición (ectópico, eutópico o control), con el fin de eliminar la variabilidad asociada a cada condición. Finalmente se realizó otro análisis de expresión diferencial entre condiciones (Ectópico vs Eutópico o Eutópico vs Control, según la comparación de interés), obteniendo así los genes que se expresan diferencialmente debido a dichas condiciones.

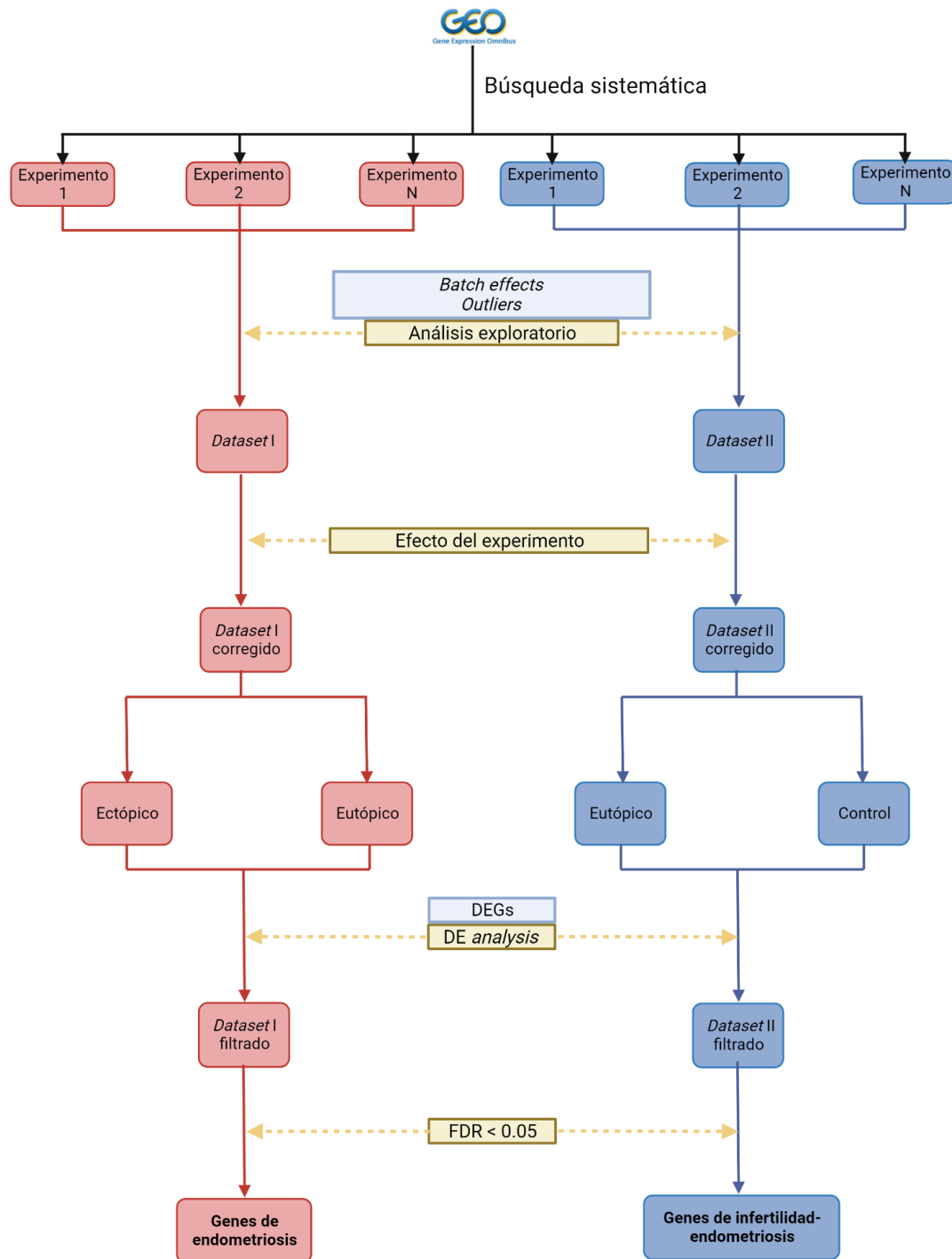


Figura 20. Metodología empleada para la extracción de genes de endometriosis y de infertilidad asociada a endometriosis mediante integración de estudios y análisis de expresión diferencial. Representación esquemática de la integración de estudios para el análisis de expresión diferencial. En primer lugar, se realizó una búsqueda de *datasets* en GEO. Posteriormente, se llevó a cabo un preprocesado y análisis exploratorio de los estudios de manera individual, con el fin de eliminar efectos indeseados o estudios inconsistentes. Una vez corregido el efecto de cada una de las variables mediante modelos lineales, se integraron los *datasets* que estudian la misma condición (p. ej. Ectópico vs Eutópico) y se eliminaron los genes diferencialmente expresados dentro de la misma condición (p. ej. ectópico). Finalmente, se realizó otro análisis

de expresión diferencial entre las dos condiciones estudiadas para obtener los genes diferencialmente expresados. *Creado con BioRender.com*

3.2. Genes relacionados con la predisposición al desarrollo de la endometriosis

Debido a la naturaleza compleja y multifactorial de la endometriosis, también se realizó una búsqueda de los genes asociados a la endometriosis mediante estudios de GWAS. Para dicho fin se consultaron diferentes bases de datos de carácter genómico que asocian un gen determinado a una enfermedad concreta. Las bases de datos consultadas fueron GWAS Catalog, Human Gene Mutation Database (HGMD), GWAS Central y Phenotype-Genotype Integrator (**Figura Suplementaria 1**). Aquellos genes con variantes genéticas significativamente asociadas a endometriosis ($P < 1 \times 10^{-5}$) fueron extraídos y se consideraron para futuros análisis.

4. Modelado de la red molecular de endometriosis e infertilidad asociada

4.1. Estudio de las relaciones moleculares entre los genes de endometriosis, la infertilidad asociada y la predisposición genética a la enfermedad: construcción de la red de endometriosis

Con el fin de estudiar las relaciones moleculares entre los diferentes genes de enfermedad obtenidos mediante las diferentes estrategias mencionadas anteriormente, se procedió a modelar la red de endometriosis. Para ello, se mapearon los genes de endometriosis en el Interactoma Humano.

En primer lugar, cada conjunto de genes (endometriosis, infertilidad asociada a endometriosis y predisposición genética a la endometriosis) fueron transformados a identificadores únicos de Ensembl mediante el paquete de R biomaRt v2.30.0, y posteriormente se mapearon en el Interactoma Humano obtenido con anterioridad.

Luego se procedió a realizar el cálculo de la media de las distancias más cortas (*average shortest paths*) entre los diferentes conjuntos de genes (desarrollo de endometriosis, infertilidad asociada y predisposición genética a la enfermedad) en el Interactoma Humano. Esto permitirá construir la red centrada en la endometriosis (**Figura 19** y **Figura Suplementaria 1**) que represente más fielmente la enfermedad, ya que los conjuntos de

genes con interacciones físicas entre sí tendrán mayor probabilidad de pertenecer realmente a la enfermedad. De este modo, se seleccionarán los conjuntos de genes más apropiados para el estudio de la enfermedad a nivel de IPP.

En primer lugar, las distancias entre los tres conjuntos de genes se analizaron por pares, empleando el análisis de proximidad de Guney y colaboradores (2016), donde la distancia entre dos conjuntos de genes se computa como la media de los caminos más cortos entre los respectivos conjuntos. Para llevar a cabo este análisis se empleó el paquete *iGraph* v.0.11.3 (Ju et al., 2016), mediante el lenguaje de programación de Python v.3.2.2 (Van Rossum & Drake, 2019). La significatividad de los resultados obtenidos proviene de la comparación de estos con los obtenidos mediante dos conjuntos de genes aleatorios del Interactoma Humano con el mismo número de genes (**Figura 21**).

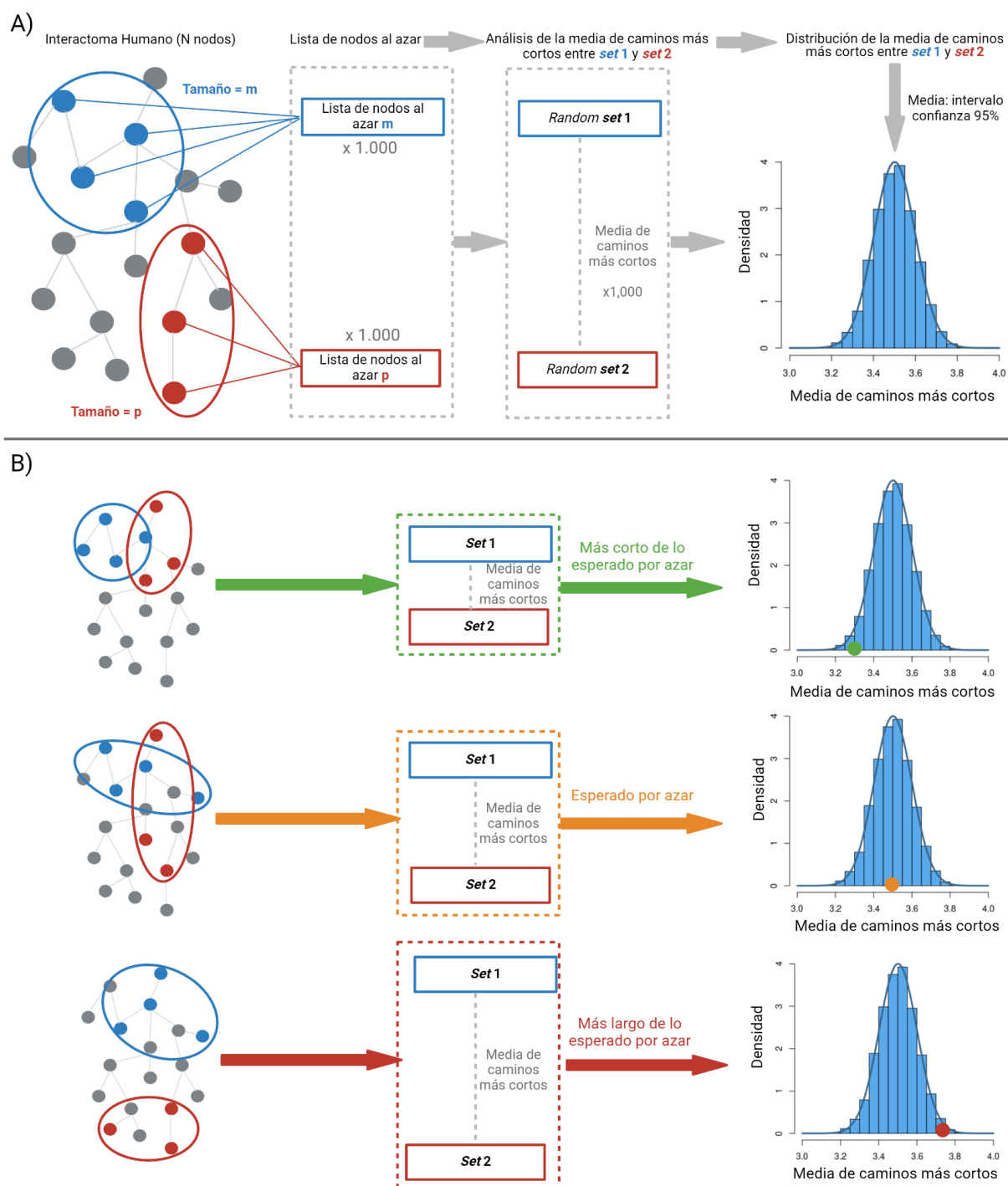


Figura 21. Esquema representativo de la metodología empleada para el cálculo de la media de la distancia de los caminos más cortos (*average shortest path length*) entre dos conjuntos de nodos de una red (set 1 y set 2). **(A)** En primer lugar, se realiza el cálculo de la media de la distancia de los caminos más cortos entre los dos conjuntos de nodos que se quieren evaluar. Posteriormente, se escogen el mismo número de nodos (genes/proteínas) al azar de cada conjunto y se realiza el mismo proceso 1.000 veces, obteniendo una distribución. **(B)** El resultado de cada análisis se compara para obtener un valor de significatividad (P-valor) con un índice de confianza del 95%. Creado con BioRender.com

En segundo lugar, y con la finalidad de analizar la relación a nivel molecular entre los diferentes conjuntos de genes de enfermedad, se realizó un test hipergeométrico de una cola, implementado mediante el lenguaje de programación en R, para examinar el nivel de solapamiento entre los diferentes conjuntos de genes. Debido a que genes involucrados en la misma enfermedad tienden a estar cerca y a agruparse en el Interactoma Humano (Barabási et al., 2011; Goh et al., 2007; Oti et al., 2006; X. Wang et al., 2011) y a que las redes moleculares densamente conectadas representan una alta similitud funcional (Koutrouli et al., 2020), sólo aquellos conjuntos que estaban significativamente más cerca de lo esperado por azar ($P < 0,05$) y tenían un solapamiento significativo ($P < 0,05$) entre sí, fueron seleccionados para construir la red de endometriosis.

Para construir la red de endometriosis, se filtró el Interactoma Humano, considerando únicamente aquellas IPP entre los conjuntos de genes seleccionados, priorizados por su mayor relación molecular. Posteriormente, se analizó su naturaleza libre de escala (*scale-free*) mediante el *plugin* Network Analyzer de Cytoscape v.3.8.2, a fin de confirmar su significado biológico y no aleatorio.

4.2. Priorización de dianas moleculares y fármacos/compuestos para la endometriosis y la infertilidad asociada

Para priorizar fármacos/compuestos potenciales (reposicionamiento de fármacos) ya aprobados en el mercado (hasta 2019), todos los fármacos aprobados y sus dianas moleculares fueron descargados de la base de datos de DrugBank v.5.0, excluyendo las dianas moleculares de origen no humano.

Las dianas moleculares de todos los fármacos aprobados fueron entonces mapeadas en la red de endometriosis, con el fin de priorizar aquellas con mayor repercusión en la red en función de determinados parámetros de red (*degree centrality* y *betweenness centrality*) (**Figura 19** y **Figura Suplementaria 1**). El *degree centrality* muestra el número de conexiones de una diana molecular en la red de endometriosis, mientras que la *betweenness centrality* muestra el número de caminos más cortos entre dos genes cualesquiera que pasan a través de un determinado gen. Ambas medidas son indicativas de la influencia que tiene un nodo (gen/proteína) a nivel local (*degree centrality*) o global (*betweenness centrality*) en la red. Para priorizar aquellas dianas moleculares con un alto valor de *degree centrality* y

betweenness centrality, se llevó a cabo el cálculo de las mismas mediante el *plugin* Network Analyzer de Cytoscape v.3.8.2, se realizó la distribución de los valores de todos los genes en la red de endometriosis y se seleccionaron aquellas dianas moleculares con un valor igual o mayor al máximo relativo de dicha distribución como las más influyentes en la fisiopatología de la endometriosis.

Además, para seleccionar aquellos fármacos/compuestos con mayor influencia en la red de endometriosis, tanto a nivel cualitativo (*degree centrality* y *betweenness centrality*) como a nivel cuantitativo, se priorizaron aquellos con dianas moleculares con alto valor de *degree centrality* y *betweenness centrality* y que además tuvieran el mayor número de dianas moleculares relacionadas con la endometriosis (fármacos promiscuos) (**Figura 19** y **Figura Suplementaria 1**). Para ello, se realizó la distribución de los valores correspondientes al número de dianas moleculares relacionadas directamente con la enfermedad que tenía cada fármaco aprobado en el mercado y se seleccionaron aquellos con el mismo valor o más alto que el máximo relativo de la distribución. De este modo, se priorizan aquellos fármacos o compuestos con un mayor número de dianas moleculares directamente relacionadas con la enfermedad y cuyas dianas moleculares tengan una alta repercusión a nivel molecular (local y global) en la endometriosis. Estos fármacos/compuestos serán considerados como potenciales para reposicionamiento en endometriosis.

5. Análisis comparativo de la eficacia a nivel molecular entre los fármacos/compuestos candidatos para reposicionamiento en endometriosis y los tratamientos actuales

Es conocido el hecho de que la mayoría de tratamientos actuales para la endometriosis carecen de eficacia para revertir la enfermedad. Uno de los métodos posibles para evaluar la eficacia de los fármacos a nivel molecular contra una determinada enfermedad consiste en analizar las distancias entre las dianas moleculares y los genes de dicha enfermedad en el Interactoma Humano, distinguiendo entre fármacos paliativos (distancias más largas de lo esperado por azar) y fármacos racionales o etiológicos (distancias más cortas de lo esperado por azar) (Guney et al., 2016; Yildirim et al., 2007).

Para evaluar la eficacia contra la endometriosis a nivel molecular y comparar con los fármacos candidatos priorizados en el apartado anterior, en primer lugar se procedió a realizar una búsqueda sistemática de los actuales tratamientos de la endometriosis. Para llevar a cabo dicha búsqueda se consultaron las principales guías de reproducción humana: European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) (Becker et al., 2022), The American Society for Reproductive Medicine (ASRM), Human Reproduction (HR) (Johnson et al., 2013), Sociedad Española de Fertilidad (SEF) y Sistema Nacional de Salud (SNS) de España (**Figura 19** y **Figura Suplementaria 1**). Para cada fármaco se anotó el tipo y la indicación (tratamiento de síntomas de endometriosis o infertilidad asociada) y si está en fase de experimentación o se emplea en clínica, excluyendo aquellos que se encuentran en fase de experimentación. Posteriormente, las dianas moleculares de estos fármacos fueron descargadas de la base de datos de DrugBank v.5.0.

Para llevar a cabo el análisis comparativo de la eficacia a nivel molecular entre los candidatos priorizados en el apartado anterior y los actuales tratamientos, se realizó un análisis de distancias (tal y como se describe en el **apartado 3.2**) entre las dianas moleculares de los fármacos o compuestos priorizados y los genes de enfermedad y entre las dianas moleculares de los fármacos actuales y los genes de enfermedad.

6. Análisis de la seguridad de los fármacos/compuestos candidatos para reposicionamiento en endometriosis

Además de la eficacia, uno de los problemas que subyacen al uso de fármacos actuales para el tratamiento de la endometriosis es la gran cantidad de efectos secundarios que presentan. Con el fin de priorizar aquellos candidatos para reposicionamiento en endometriosis con menores efectos secundarios, se analizaron la cantidad y gravedad de los mismos en los fármacos priorizados. Además, se realizó un análisis farmacogenético en el que se estudiaron las variantes genéticas que dan lugar a una variabilidad tanto en la eficacia de los fármacos como en la aparición de efectos secundarios indeseados. Por otra parte, se realizó un análisis de interacción fármaco-fármaco, con el fin de evaluar posibles combinaciones de los fármacos candidatos priorizados (**Figura 19** y **Figura Suplementaria 1**).

Para llevar a cabo el estudio de los efectos secundarios de cada uno de los fármacos candidatos priorizados, se realizó una revisión manual de las etiquetas de cada uno de ellos mediante la consulta de la ficha técnica en la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Aquellos fármacos/compuestos con los menores efectos secundarios y menor gravedad fueron finalmente seleccionados como fármacos/compuestos candidatos.

Adicionalmente, para facilitar futuros estudios y la implementación de una medicina personalizada en el caso de ser empleados en la práctica clínica, se consultaron las variantes farmacogenéticas susceptibles de provocar una diferente respuesta a fármacos en la población. Para ello se extrajeron las variantes con mayor nivel de evidencia clínica de la base de datos PharmGKB, en el apartado “*Clinical Annotations*” (acceso en junio de 2023). Las anotaciones clínicas de PharmGKB brindan información sobre pares de variantes y medicamentos basándose principalmente en anotaciones de variantes e incorporando pautas de prescripción específicas para variantes con efecto clínico y etiquetas de medicamentos aprobados por la FDA.

Para llevar a cabo el análisis de interacciones fármaco-fármaco, se consultó la base de datos de DrugBank v.5.0, extrayendo la información relativa a las interacciones entre los fármacos candidatos priorizados que dan lugar a una variabilidad en la eficacia y/o toxicidad.

7. Validación en la literatura del mecanismo de acción de los fármacos/compuestos candidatos para el tratamiento de la endometriosis y la infertilidad asociada

Con el fin de evaluar la posible aplicación de los fármacos y compuestos candidatos priorizados mediante el modelo basado en farmacología de sistemas, se procedió a realizar una búsqueda extensiva en la literatura científica del uso y eficacia de los mismos para el tratamiento de la endometriosis y/o la infertilidad. De esta manera se realizó una búsqueda en Google Scholar, PubMed y ClinicalTrials.gov (<https://www.clinicaltrials.gov/>), hasta junio de 2023, empleando las siguientes palabras clave: ‘endometriosis’ OR ‘infertility’ AND ‘nombre del fármaco/compuesto’, con el fin de evaluar estudios que valoraran la aplicabilidad de estos fármacos o compuestos en el tratamiento de la endometriosis y/o la infertilidad (**Figura 19** y

Figura Suplementaria 1). En este contexto, para cada estudio se anotó el fármaco/compuesto empleado, la dosis, tipo de estudio (*in silico*, *in vitro* o *in vivo*), sujetos empleados (humano o animal), número de muestras, tipo de muestra/tejido estudiada, efectos fenotípicos estudiados y un resumen del efecto del fármaco/compuesto en el tratamiento de la endometriosis, de otras enfermedades reproductivas o de la infertilidad.

8. Análisis *in vitro* de la eficacia de los fármacos/compuestos candidatos priorizados contra la endometriosis

8.1. Aislamiento de células epiteliales endometriales, línea celular de endometriosis y condiciones de cultivo

Con la finalidad de validar experimentalmente los resultados obtenidos del modelo de predicción de endometriosis, se evaluó *in vitro* la efectividad de los compuestos candidatos con menos efectos secundarios (**Figura 19** y **Figura Suplementaria 1**). Para tal fin, se emplearon células epiteliales endometriales procedentes de biopsias de participantes sanas (HEEC, *Human Endometrial Epithelial Cells*) y una línea celular epitelial de endometriosis, 12Z (Applied Biological Materials, T0764. Vancouver, Canadá). Todas las participantes firmaron el consentimiento informado y el proyecto (1706-FIVI-048-PD) fue aprobado por el Comité Revisor Institucional sobre el uso de seres humanos en investigación del Instituto Valenciano de Infertilidad, cumpliendo con la Ley Española de Tecnologías de Reproducción Asistida (35/1988).

Las biopsias endometriales fueron disgregadas mecánicamente en trozos de menos de 1 mm con dos cuchillas esterilizadas, separando la sangre y la mucosidad. Posteriormente, las muestras fueron digeridas durante 1 h a 37°C en un baño agitador con 0,1% de collagenasa tipo IA (Sigma-Aldrich. Madrid, España) en DMEM (Sigma-Aldrich. Madrid, España). Las HEEC fueron aisladas de las células estromales mediante filtración. Para ello, se añadió el contenido en un tubo estéril de 15 mL. Tras 10 min, se observó la separación en fases de las HEEC y las células estromales, quedando las HEEC en el precipitado. Para el aislamiento de las HEEC se empleó un filtro de 50 µm.

Las HEEC y las células 12Z fueron cultivadas en un medio, Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12) / MCDB 131 Medium (Sigma-Aldrich.

Madrid, España) (3:1), suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich. Madrid, España) y 0,1% (v/v) de gentamicina y fungizona (Sigma-Aldrich. Madrid, España), en un ambiente controlado a 37°C y 5% de CO₂.

8.2. Ensayo de dosis y viabilidad celular en HEEC y 12Z

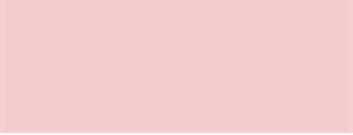
Para el ensayo de dosis se realizó un estudio de viabilidad celular en las HEEC con diferentes concentraciones de los compuestos candidatos: resveratrol (10-500 µM) (Santa Cruz Biotechnology, sc-200808. Heidelberg, Alemania), adenina (50-800 µM) (Santa Cruz Biotechnology, sc-291834. Heidelberg, Alemania), glutatión (500-2.000 µM) (Santa Cruz Biotechnology, sc-29094. Heidelberg, Alemania), acetato de zinc dihidrato (100-200 µM) (Sigma-Aldrich, C8027. Madrid, España), sulfato de cobre (II) pentahidratado (10-50 µM) (Sigma-Aldrich, 96459. Madrid, España) y NADH (500-2.000 µM) (Santa Cruz Biotechnology, sc-205762. Heidelberg, Alemania). En primer lugar se sembraron $1,5 \times 10^4$ células/pocillo en una placa de 96 pocillos y éstas fueron suplementadas con las diferentes concentraciones de cada compuesto durante 24 h, empleando tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas para cada concentración. El análisis de viabilidad celular se llevó a cabo mediante colorimetría, empleando el kit comercial The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega. Madrid, España), que determina el número de células viables en un cultivo celular. El kit consta de un compuesto, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, (MTS), el cuál es reducido por las células y se transforma en un producto coloreado, formazán, que es soluble en el medio de cultivo. La cantidad de formazán medida por absorbancia a 490 nm es directamente proporcional al número de células vivas en el medio de cultivo. Se añadieron 20 µL de MTS a cada pocillo, dejando actuar durante 3 h, y la absorbancia fue determinada mediante el lector de microplacas SpectraMax 190 (bioNova científica S.L. Madrid, España). Como vehículo (control) se empleó el medio en el que estaban disueltos los compuestos.

Los valores obtenidos fueron normalizados teniendo en cuenta la absorbancia del vehículo, y se realizó un test t-Student para evaluar la significatividad de las diferencias en la viabilidad celular. Tras seleccionar las dosis correspondientes de cada compuesto, éstas se probaron en la línea celular de endometriosis inmortalizada 12Z, con el fin de determinar qué compuestos afectan a su viabilidad ($P < 0,05$), siguiendo el mismo procedimiento.

Resultados

“Lo que conocemos es una gota de agua. Lo que ignoramos es un océano.”

- *Isaac Newton*



1. Selección de genes de enfermedad

Con el objetivo de identificar aquellos genes importantes para la enfermedad en lo referente a la interacción entre genes y ambiente, se llevó a cabo una revisión de *datasets* en la base de datos de GEO, encontrando cinco estudios en los que se analizaba la expresión génica en tejido ectópico de pacientes con endometriosis y tejido eutópico de las mismas pacientes, y tres estudios en los que se analizaba la expresión génica en tejido eutópico de pacientes con endometriosis y endometrio de mujeres sanas (control). Las pacientes con endometriosis analizadas en los diferentes estudios presentaban un estadio de endometriosis II-IV y se encontraban en diferentes fases del ciclo menstrual (**Tabla Suplementaria 1**). Dichos análisis fueron realizados con diferentes plataformas de *microarray* o secuenciación de ARN (RNAseq).

Para la selección de estos genes se llevó a cabo, en primer lugar, un análisis exploratorio, con el fin de analizar la presencia de *outliers* técnicos o algún efecto de otras variables, como la fase del ciclo menstrual, el estado de la endometriosis o la edad de las pacientes que pudieran enmascarar el efecto de la expresión génica en posteriores análisis. En dicho análisis exploratorio se observó un efecto desconocido en el estudio GSE37837 y la presencia de *outliers* técnicos en algunos de ellos (**Figura 22**).

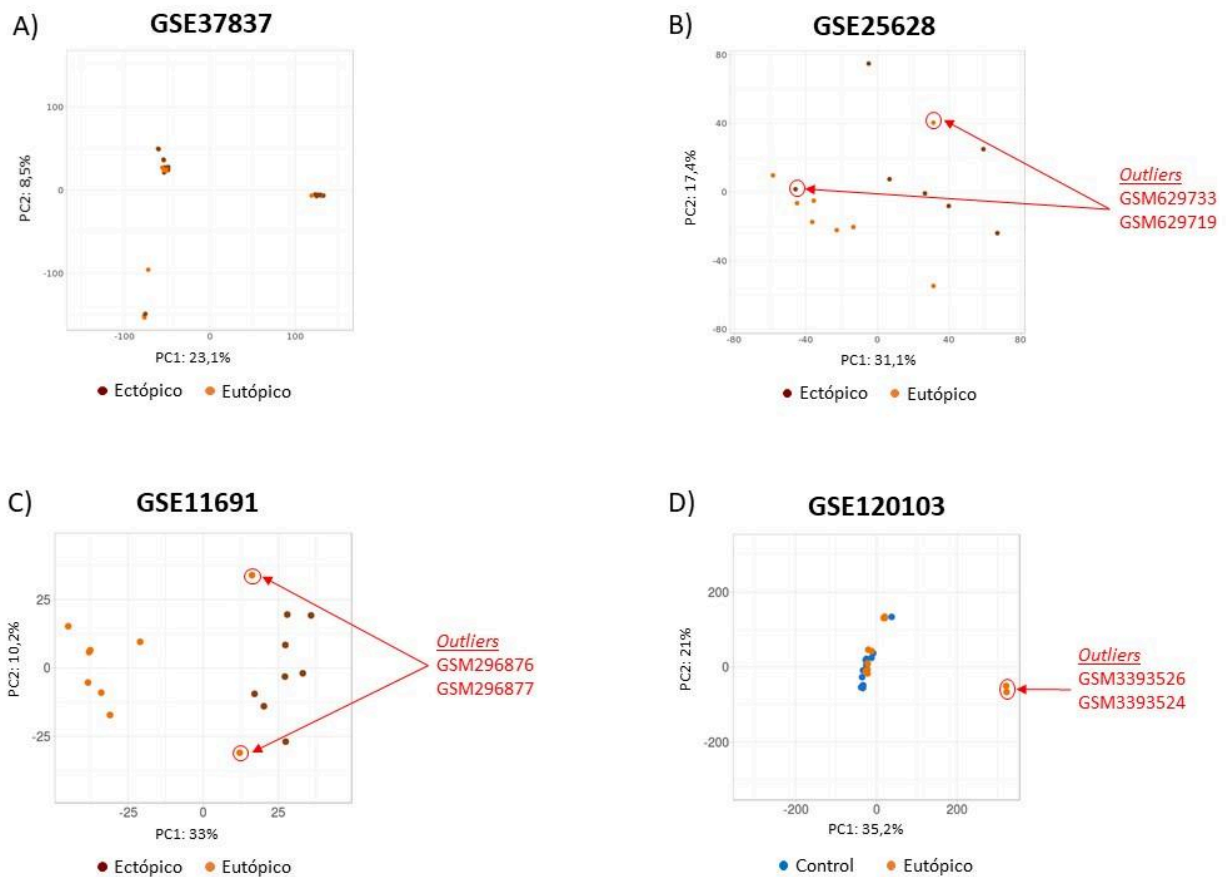


Figura 22. Análisis exploratorio de los estudios GSE37837, GSE25638, GSE11691 y GSE120103. En el estudio GSE37837 ($n = 36$ muestras) se observó un efecto desconocido que enmascara los resultados del análisis de expresión diferencial de genes, por lo que fue descartado para futuros análisis. Por otro lado, en los estudios GSE25628 ($n = 15$ muestras), GSE11691 ($n = 17$ muestras) y GSE120103 ($n = 34$ muestras) se observaron dos *outliers* técnicos en cada uno de ellos que fueron eliminados para posteriores análisis.

PC1, principal component 1 (componente principal 1); *PC2*, principal component 2 (componente principal 2)

Una vez eliminados los *outliers* técnicos, se realizó un análisis de las diferentes variables que podrían interferir en los futuros análisis para cada uno de los estudios (*batch effect* o efecto de tanda). Se observó un efecto de la fertilidad asociada a la endometriosis en el estudio GSE120103 y un efecto de la fase del ciclo menstrual en el estudio GSE6364, que fueron corregidos mediante el empleo de modelos lineales, utilizando el paquete *limma*, implementado mediante el lenguaje de programación R.

Tras llevar a cabo el preprocesado y análisis exploratorio de cada uno de los estudios, finalmente fueron seleccionados cuatro estudios en los que se analiza la expresión diferencial de genes en tejido ectópico ($n = 32$ muestras) y tejido eutópico ($n = 32$ muestras) de pacientes con endometriosis, y tres estudios en los que se analiza la expresión génica en tejido eutópico

(n = 43 muestras) de pacientes con endometriosis y endometrio control (n = 40 muestras) de mujeres sin la enfermedad (**Tabla 3**).

Tabla 3. Clasificación de los estudios empleados para seleccionar los genes asociados a la endometriosis, tanto aquellos con efecto en el tejido *ex situ* (A), como en el propio endometrio (B). Se representa el identificador de cada estudio, el año en el que fue realizado, el número de muestras de tejido ectópico, el número de muestras de tejido eútopico, el número de muestras de tejido control (endometrio normal), el estadio de la endometriosis (I-IV), la fase del ciclo menstrual y la plataforma de *microarray* o RNAseq empleada.

A) Estudios de Ectópico vs Eutópico

Estudio	Año	Ectópico	Eutópico	Estadio	Fase ciclo	Plataforma
GSE105764	2018	8	8	III-IV	SEC	Illumina HiSeq 4000
GSE11691	2008	7	8	II-IV	PRO, SEC	HG-U133-A
GSE25628	2013	7	6	II-IV	PRO	HG-U133-A2
GSE7305	2007	10	10	n/d	FOL, LUT	HG-U133-Plus2

B) Estudios de Eutópico vs Control

Estudio	Año	Eutópico	Control	Estadio	Fase ciclo	Plataforma
GSE120103	2019	14	18	IV	n/d	Agilent 4x44K
GSE25628	2013	8	6	II-IV	PRO	HG-U133-A2
GSE6364	2007	21	16	IV	PRO, ESE, MSE	HG-U133-Plus2

SEC, secretora; PRO, proliferativa; FOL, folicular; LUT, lútea; ESE, early secretory (secretora temprana); MSE, mild secretory (secretora media); n/d, no disponible

Se hallaron un total de 10.467 genes en común entre los cuatro estudios de Ectópico vs Eutópico y un total de 11.234 entre los tres estudios de Eutópico vs Control (**Figura 23**).

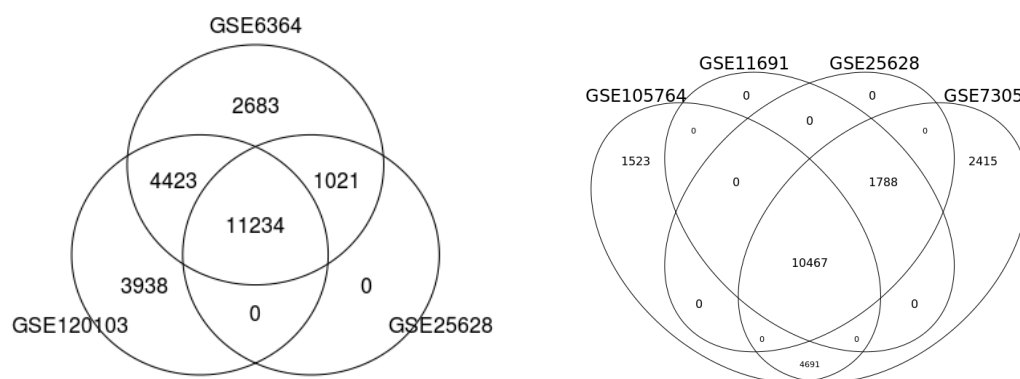


Figura 23. Diagramas de Venn mostrando el número de genes incluidos en cada estudio seleccionado y los genes compartidos entre los mismos. (A) Genes en común entre los estudios de Ectópico y Eutópico. (B) Genes en común entre los estudios de Eutópico y control.

Por un lado, tras integrar los cuatro estudios de **Ectópico vs Eutópico** ($n = 64$ pacientes), eliminar el efecto asociado a cada estudio y los DEGs dentro de cada condición, y realizar el análisis de expresión diferencial, se obtuvieron un total de 4.176 DEGs ($FDR < 0,05$) (**Figura 24**).

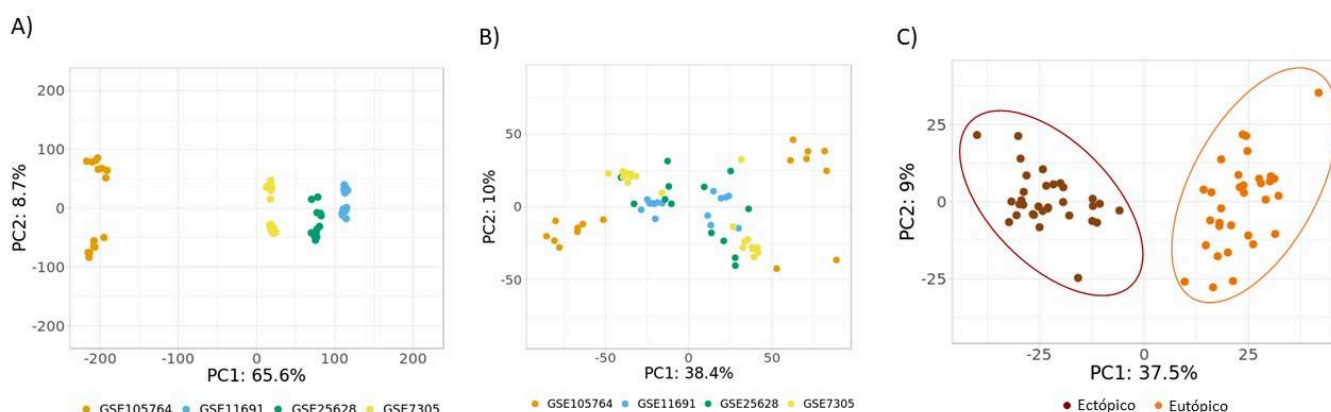


Figura 24. Análisis exploratorio de la expresión génica de los estudios de endometrio Ectópico vs Eutópico. Análisis de componentes principales de: (A) datos crudos de los estudios integrados de Ectópico vs Eutópico con un total de 10.467 genes y 64 muestras; (B) resultado tras eliminar el efecto asociado a cada estudio; (C) resultado obtenido con los genes evaluados finalmente.

PC1, principal component 1 (componente principal 1); PC2, principal component 2 (componente principal 2)

Por otro lado, tras la integración de los tres estudios de **Eutópico vs Control**, eliminar el efecto asociado a cada estudio y los DEGs dentro de cada condición y realizar el análisis de expresión diferencial, se obtuvieron un total de 831 DEGs ($FDR < 0,05$) (**Figura 25**).

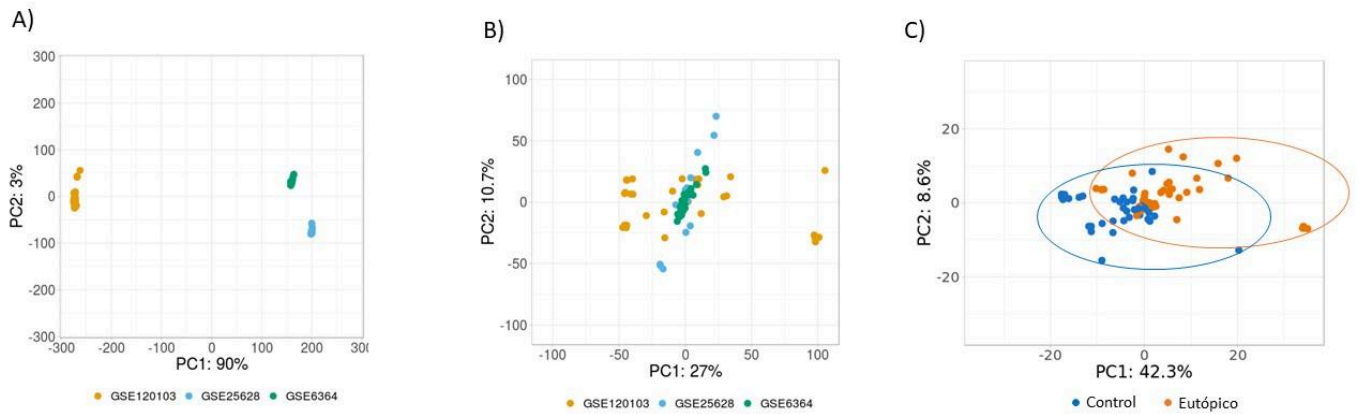


Figura 25. Análisis exploratorio de la expresión génica de los estudios de endometrio Eutópico vs Control.

Análisis de componentes principales de: **(A)** datos crudos de los estudios integrados de Eutópico vs Control con un total de 11.234 genes y 83 muestras; **(B)** resultado tras eliminar el efecto asociado a cada estudio; y **(C)** resultado obtenido con los genes evaluados finalmente.

PC1, principal component 1 (componente principal 1); PC2, principal component 2 (componente principal 2);

Los DEGs entre las condiciones de Ectópico vs Eutópico serán considerados como genes relacionados con la progresión y desarrollo de la endometriosis, y los DEGs entre las condiciones de Eutópico vs Control como genes relacionados con la infertilidad asociada a la endometriosis.

Además, para estudiar el componente genético asociado a la enfermedad, se extrajeron aquellos genes relacionados con la endometriosis derivados de GWAS (*Genome-Wide Association Studies*). En este caso fueron hallados un total de 128 genes con cambios en la secuencia del ADN, asociados a la endometriosis ($P < 1 \times 10^{-5}$).

2. Construcción del Interactoma Humano

El Interactoma Humano se construyó mediante la integración de experimentos de alto rendimiento (HuRI) de doble híbrido y validación ortogonal y los derivados de la literatura, con al menos dos evidencias experimentales (Lit BM). HuRI estaba compuesto por 9.094 proteínas únicas y 64.006 interacciones, mientras que Lit-BM contaba con 4.047 proteínas únicas y 13.441 interacciones. Seis proteínas y 111 interacciones fueron descartadas por no presentar identificador en la base de datos de Ensembl. Finalmente, se obtuvo un Interactoma Humano compuesto por 11.517 proteínas únicas con 75.251 IPP. A pesar de que se observan algunos nodos (proteínas) aislados, esta red presentaba un $R^2 = 0,919$, lo que indica que la red

es *scale-free*, confirmándose así que se asemeja a una red biológica real, tal y como cabría esperar (**Figura 26**).

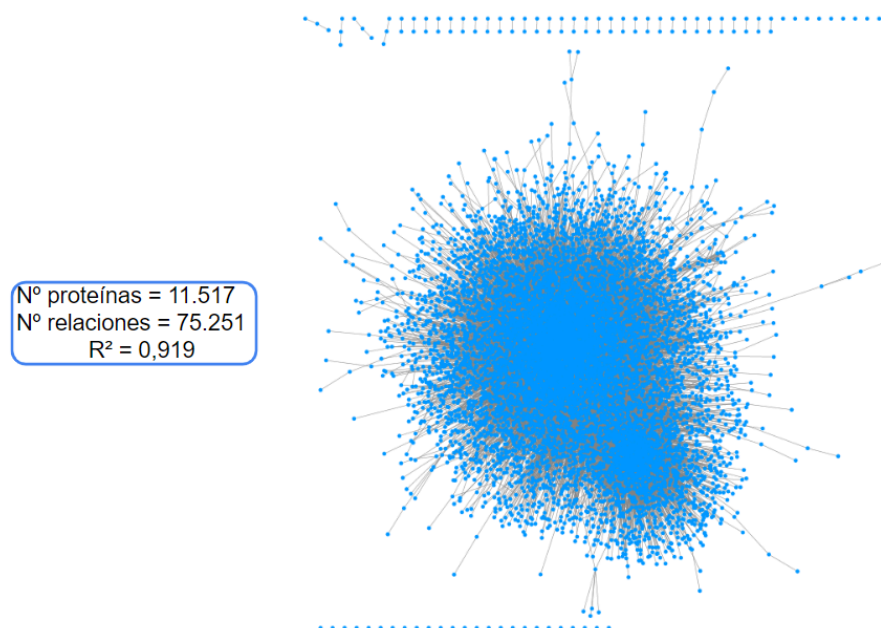


Figura 26. Interactoma Humano. Los nodos de la red representan proteínas y las aristas interacciones físicas entre proteínas (IPP) validadas experimentalmente.

3. Modelo sistémico de la endometriosis para la priorización de fármacos/compuestos candidatos

3.1. Modelado de la red de endometriosis

El primer paso para el desarrollo del modelo de priorización consistió en estudiar las relaciones moleculares entre los diferentes genes de enfermedad (priorizados por estudios de GWAS o por expresión génica diferencial), con el fin de construir una red molecular que representase más fielmente la enfermedad y aquellos procesos biológicos en común que permitiesen priorizar fármacos o compuestos dirigidos a las mismas.

Para llevar a cabo este análisis, los diferentes conjuntos de genes de las diferentes condiciones de la enfermedad fueron mapeados en el Interactoma Humano. De los 4.176 DEGs relacionados con el desarrollo y progresión de endometriosis (conjunto de genes de Ectópico) mapearon un total de 2.931 genes (70%). En el caso de los genes referentes a la infertilidad asociada a la endometriosis (conjunto de genes de Eutópico), de los 831 DEGs obtenidos, mapearon 553 genes (67%). Finalmente, de los 128 genes relacionados con la

predisposición genética a la endometriosis (conjunto de genes de GWAS), mapearon 44 genes (34%).

Tras analizar el solapamiento entre los diferentes conjuntos de genes, se observó un solapamiento significativo de los genes de Ectópico y Eutópico, con 210 genes en común ($P = 1.9 \times 10^{-11}$) (**Figura 27A y Tabla 5**). No se obtuvieron resultados significativos en las demás comparaciones: Ectópico vs GWAS y Eutópico vs GWAS ($P > 0,05$). Por otro lado, en el análisis de distancias también se observó que los conjuntos de genes de Ectópico y Eutópico estaban más cerca entre ellos de lo esperado por azar ($P = 0,04$) (**Figura 27B y Tabla 5**), lo que indica una estrecha relación a nivel molecular entre estos conjuntos de genes.

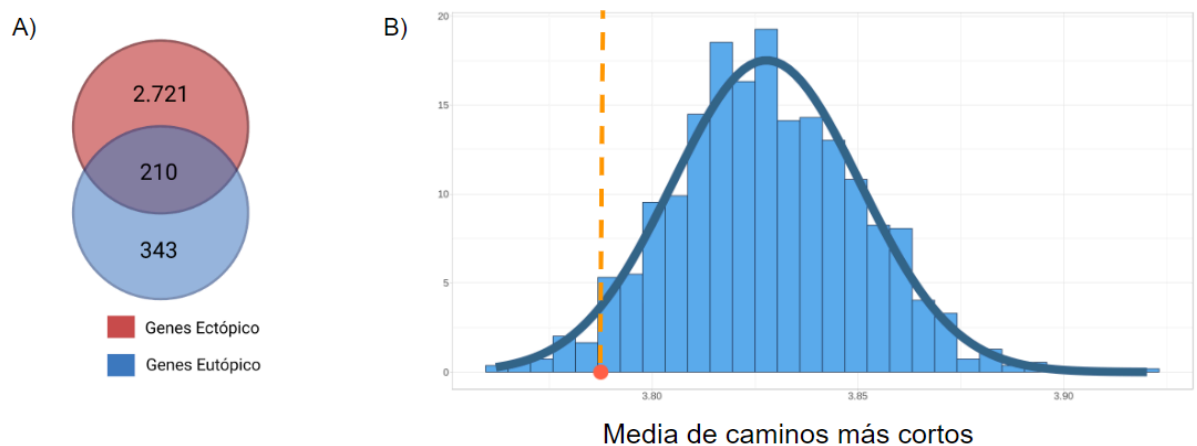


Figura 27. Análisis de solapamiento y de distancias para la comparación Ectópico vs Eutópico. (A) El análisis de solapamiento mostró 210 genes en común entre ambas condiciones ($P = 1,91 \times 10^{-11}$). (B) El análisis de distancias mostró una distancia menor de lo esperado por azar para los dos conjuntos de genes ($P = 0,04$).

Tabla 5. Análisis de solapamiento y de distancias entre los diferentes conjuntos de genes de enfermedad. Se muestra el P-valor derivado de cada análisis.

Comparación	Solapamiento (P)	Proximidad (P)
Ectópico vs Eutópico	$1,91 \times 10^{-11}$ ***	0,04 *
Ectópico vs GWAS	0,07	0,16
Eutópico vs GWAS	0,63	0,22

GWAS, genome-wide association studies; P, p-valor; *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$

Debido a la falta de relación a nivel molecular con el resto de conjuntos de genes, el conjunto de genes de GWAS fue excluido para la construcción de la red de enfermedad, y sólo se tuvieron en cuenta los conjuntos de genes de Ectópico y de Eutópico para dicho fin (**Figura 28**). Este resultado podría esperarse debido al distinto modo de priorización de genes (por estudios de GWAS y por expresión génica).

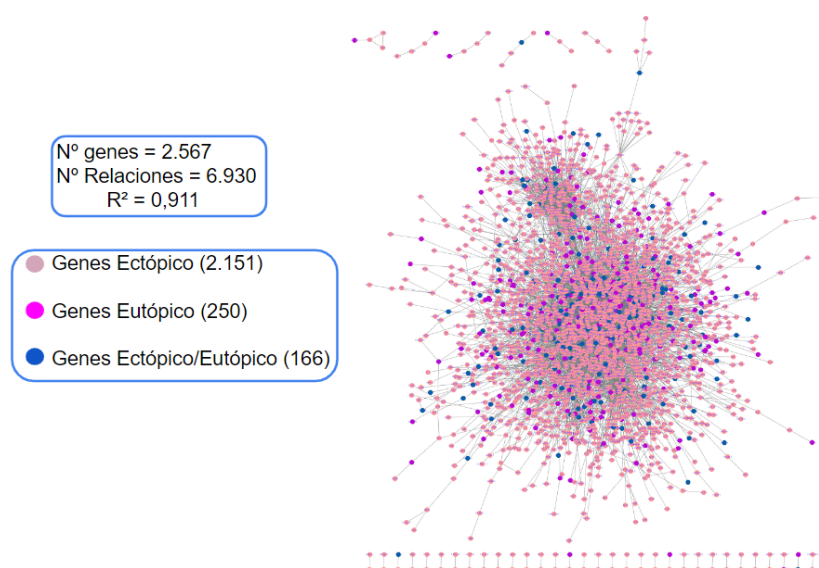


Figura 28. Red de endometriosis. Red generada tras integrar los conjuntos de genes de Ectópico y Eutópico en el Interactoma Humano. Se muestran las interacciones físicas (IPP) entre los conjuntos de genes.

La red de endometriosis, que será posteriormente empleada para la priorización de fármacos, estaba compuesta por un total de 2.567 genes (2.151 de Ectópico, 250 de Eutópico y 166 de ambos) y 6.930 relaciones (IPP) entre ellos. Dicha red era *scale-free*, con un $R^2 = 0,911$, lo que indica que se asemeja a una red biológica real y, por tanto, se pueden inferir los principios de la farmacología de sistemas.

3.2. Selección de fármacos aprobados para reposicionamiento en endometriosis

Con el fin de priorizar fármacos o compuestos aprobados para otras indicaciones en endometriosis, se seleccionaron aquellos de la base de datos de DrugBank cuyo uso ha sido aprobado en Estados Unidos, Europa o Canadá, excluyendo aquellos en fase de investigación o experimentación y los ilegales o retirados del mercado. De los 3.883 fármacos/compuestos aprobados, se obtuvieron 2.235 que contenían información sobre sus dianas moleculares.

3.3. Selección de fármacos actuales para el tratamiento de la endometriosis

Para evaluar la eficacia a nivel molecular de los principales tratamientos actuales empleados para la endometriosis, dichos tratamientos fueron identificados a partir de las principales guías de reproducción. En total se encontraron 44 fármacos aprobados para su uso en endometriosis, excluyéndose aquellos en investigación. En la **Tabla 6** se muestran los fármacos obtenidos, clasificados por su modo de acción y la indicación correspondiente relacionada con la endometriosis.

Tabla 6. Fármacos empleados para endometriosis actualmente. Se muestra el nombre de cada fármaco, el tipo y la indicación.

Fármaco	Tipo	Indicación
Paracetamol	Analgésico	Dolor
Amitriptilina	Analgésico	Dolor
Anastrozol	IA	Dolor
Buserelina	GnRH-a	Dolor
HCG	COS	Infertilidad
Clomifeno	COS	Infertilidad
Acetato de ciproterona	Progestina	Dolor
Danazol	Andrógeno	Dolor
Desogestrel	Progestina	Dolor
Dienogest	Progestina	Dolor
Duloxetina	Analgésico	Dolor
Didrogesterona	Progestina	Dolor
Elagolix	GnRH-ant	Dolor

Estradiol	Estrógeno	Dolor
Etinilestradiol	Estrógeno	Dolor
Etonogestrel	Anticonceptivo	Dolor
Exemestano	IA	n/d
Fentanilo	Opioide	Dolor
Folitropina	COS	Infertilidad
Gabapentina	Analgésico	Dolor
Gestrinona	Anticonceptivo	Dolor
Goserelina	GnRH-a	Dolor
Ibuprofeno	Analgésico	Dolor
Letrozol	IA	Dolor/Infertilidad
Leuprorelina	GnRH-a	Dolor
Levonorgestrel	Progestina	Dolor
MPA	Progestina	Dolor
Megestrol acetato	SPRM	n/d
Metamizol	Analgésico	Dolor
Metadona	Opioide	Dolor
Mifepristona	SPRM	Dolor
Morfina	Opioide	Dolor
Nafarelina	GnRH-a	Dolor
Naproxeno	Analgésico	Dolor

Nomegestrol	Anticonceptivo	Dolor
Norelgestromina	Anticonceptivo	Dolor
Noretisterona	Anticonceptivo	Dolor
Pregabalina	Analgésico	Dolor
Progesterona	Anticonceptivo	Dolor
Rofecoxib	Analgésico	Dolor
Tibolona	SERM	Dolor
Triptorelina	GnRH-a	Dolor
Tiamina	Vitamina	Dolor
Piridoxina	Vitamina	Dolor

HCG, human chorionic gonadotropin (gonadotropina coriónica humana); MPA, medoxyprogesterone acetate (acetato de medoxiprogesterona); IA, inhibidor de la aromatasa; COS, controlled ovarian stimulation (estimulación ovárica controlada); GnRH-a, agonistas de la GnRH; GnRH-ant, antagonistas de la GnRH; SPRM, selective progesterone receptor modulator (modulador selectivo del receptor de progesterona); SERM, selective estrogen receptor modulator (modulador selectivo del receptor de estrógenos); n/d, no disponible

Entre los principales grupos de fármacos encontramos anticonceptivos, progestinas, fármacos para la estimulación ovárica, SPRM, SERM, andrógenos, estrógenos, analgésicos o AINEs, inhibidores de la aromatasa, opioides y vitaminas. Como se puede apreciar en la tabla, los fármacos empleados para el tratamiento de la endometriosis se basan principalmente en el tratamiento del dolor o la infertilidad asociados a la aparición de la enfermedad. La mayoría de ellos son tratamientos hormonales (61%), en su mayoría compuestos por anticonceptivos orales (33%). Por otro lado, los analgésicos son los principales tratamientos no hormonales empleados (52%), cuya indicación fundamental es el tratamiento del dolor.

Tras extraer sus dianas moleculares de la base de datos de DrugBank, se obtuvieron un total de 142 dianas moleculares para todos los fármacos aprobados para su uso en endometriosis extraídos de las principales guías de reproducción.

3.4. Modelo basado en farmacología de sistemas para la priorización de fármacos/compuestos en endometriosis

Con el fin de priorizar potenciales fármacos o compuestos para el tratamiento de la endometriosis, se empleó la red de endometriosis (**Sección 3.1 de Resultados**), elaborada mediante la integración de genes de Ectópico y Eutópico. Sobre esta red se mapearon todas las dianas moleculares de todos los fármacos/compuestos aprobados en el mercado (**Sección 3.2 de Resultados**), con el fin de analizar parámetros topológicos de las dianas moleculares incluidas en la red, lo que permitirá priorizar aquellos fármacos/compuestos que tengan una mayor repercusión en la misma, tanto a nivel cualitativo (mayor *degree* y *betweenness centrality*) como a nivel cuantitativo (mayor número de dianas moleculares relacionadas con la enfermedad), en la red de endometriosis.

Tras analizar la distribución de los diferentes parámetros de red (**Figura 29**), se priorizaron aquellos compuestos promiscuos (gran número de dianas moleculares relacionadas con endometriosis) que, además, tenían dianas moleculares con alto *degree* y *betweenness centrality* (por encima del máximo relativo de la distribución).

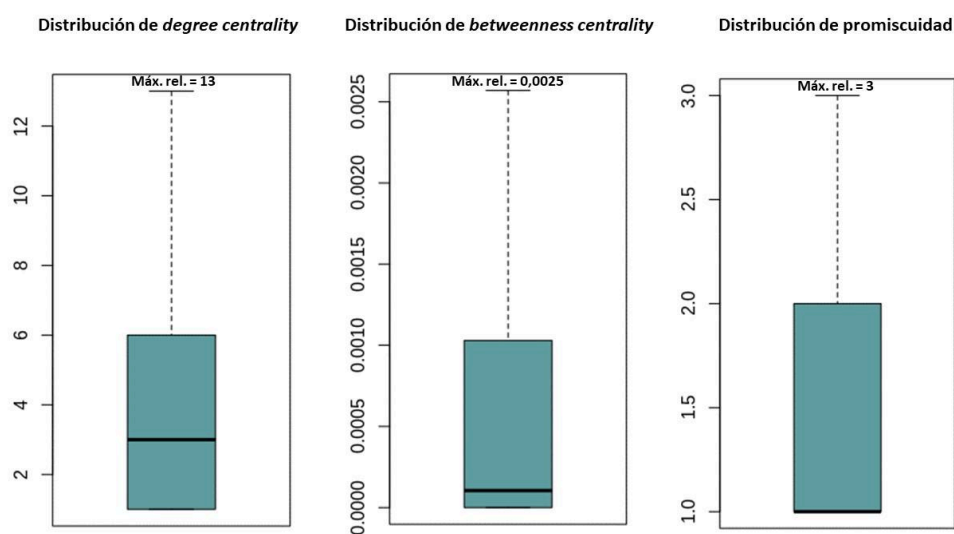


Figura 29. Distribución de parámetros empleados para priorización de dianas moleculares y fármacos/compuestos para endometriosis. Fueron priorizados aquellas dianas moleculares y fármacos/compuestos que cumplieron con los tres criterios de priorización (*degree centrality* ≥ 13 , *betweenness*

$centrality \geq 0,0025$ y número de dianas de endometriosis ≥ 3). Los ejes de las Y representan los valores de *degree centrality*, *betweenness centrality* y número de dianas moleculares respectivamente.

De un total de 3.883 fármacos o compuestos aprobados en la base de datos de DrugBank, 130 presentaron alguna diana molecular con una gran cantidad de conexiones al resto de genes de endometriosis ($degree centrality \geq 13$) y, por tanto, una alta influencia local en la red de endometriosis. Otros 188 presentaron alguna diana molecular con alta influencia global ($betweenness centrality \geq 0,0025$) en la red de endometriosis, y 41 fueron promiscuos (n° de dianas moleculares de endometriosis ≥ 3). De todos ellos, 16 compuestos cumplieron todos los criterios de priorización (**Figura 30**):

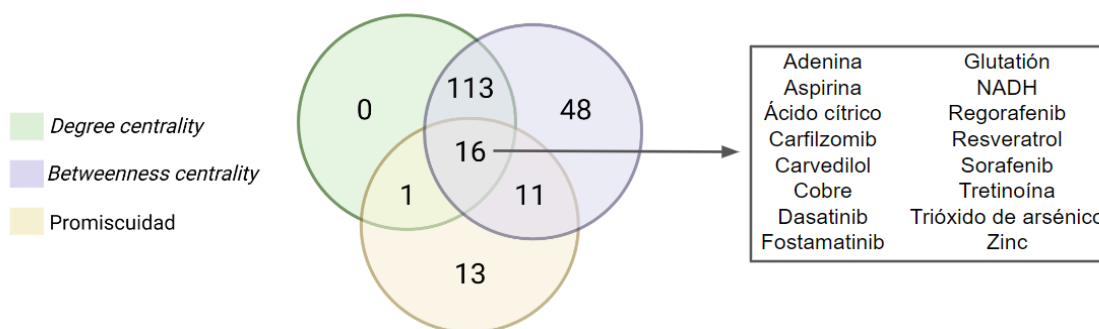


Figura 30. Diagrama de Venn. Se muestra el número de fármacos/compuestos aprobados que cumplen cada uno de los criterios de priorización por separado y los 16 fármacos/compuestos candidatos que cumplieron todos los criterios de priorización.

Los 16 fármacos/compuestos priorizados tenían un total de 772 dianas moleculares asociadas, de las cuales 311 (40,3%) eran genes relacionados con la endometriosis (253 relacionados con la progresi3n y desarrollo de la enfermedad y 58 relacionados con la infertilidad asociada). Todos los compuestos priorizados tenían alguna diana molecular asociada, tanto al desarrollo y progresi3n de la endometriosis (ect3pico) como a la infertilidad asociada (eut3pico), con excepci3n del glutati3n, 3cido cítrico, aspirina, tretino3ina y sorafenib, los cuales presentaron s3lo genes relacionados con el desarrollo y progresi3n de la endometriosis. De los priorizados, la adenina mostr3 el mayor porcentaje de dianas moleculares asociadas con la endometriosis (83,3%). Por otro lado, el zinc y el cobre mostraron mecanismos moleculares m3s similares entre ellos, compartiendo un total de 14 dianas moleculares (**Figura 31**).

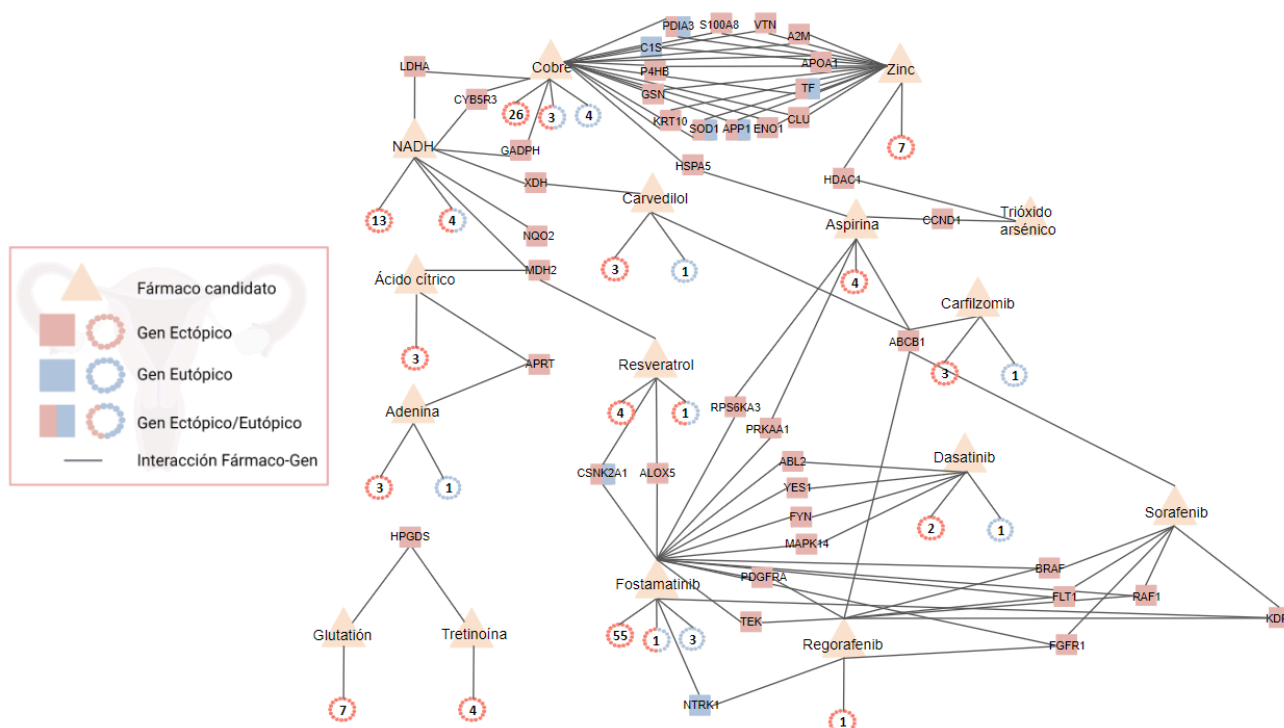


Figura 31. Red molecular mostrando los mecanismos en común de los fármacos/compuestos priorizados para endometriosis. Los triángulos hacen referencia a los fármacos o compuestos priorizados, los cuadrados indican dianas moleculares relacionadas con la endometriosis (ectópico, eutópico o ambos), los círculos indican las dianas moleculares de endometriosis (ectópico, eutópico o ambos) no compartidas entre ninguno de los candidatos priorizados y las líneas continuas indican interacción fármaco-gen.

4. Evaluación de la efectividad a nivel molecular de los fármacos/compuestos candidatos priorizados para reposicionamiento en endometriosis

Con el fin de evaluar la eficacia a nivel molecular de los candidatos priorizados, se analizaron las distancias de sus dianas moleculares a los genes de Ectópico (progresión y desarrollo de la enfermedad) y Eutópico (infertilidad asociada a la enfermedad) en el Interactoma Humano. En dicho análisis se observó que las distancias eran menores de lo esperado por azar ($P < 0,05$) (**Figura 32B**), lo que implica una estrecha relación a nivel molecular entre los mismos y la posibilidad de ser reposicionados para la enfermedad.

Por otro lado, con el fin de comparar la efectividad de los fármacos actuales con los candidatos priorizados, se evaluó la distancia relativa de las dianas moleculares de los mismos a los genes de enfermedad en la red de endometriosis. Se observó, que a diferencia

de los candidatos priorizados, los fármacos actuales tenían una distancia mayor de lo esperado por azar ($P > 0,05$) (**Figura 32A**), lo que indica que los candidatos podrían ser más efectivos para tratar la endometriosis que los fármacos actuales.

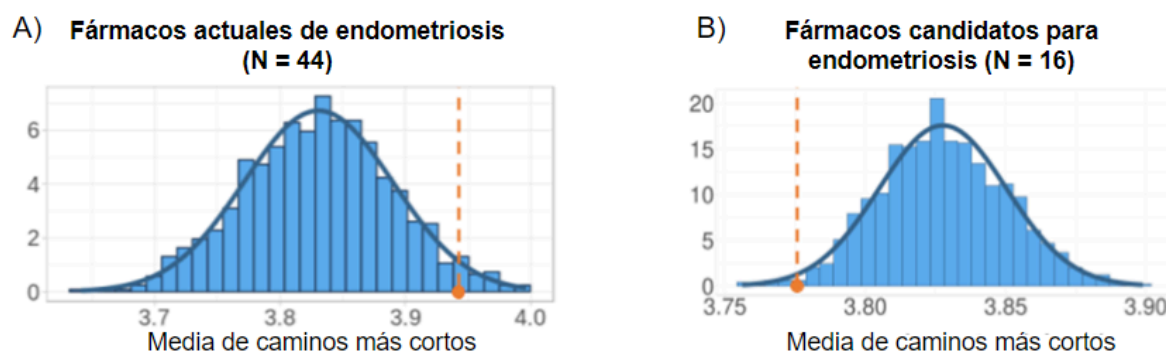


Figura 32. Media de los caminos más cortos entre dianas moleculares y genes de enfermedad (Ectópico y Eutópico) en la red de endometriosis. (A) Distancia de los fármacos actuales para el tratamiento de la endometriosis ($P = 0,97$). **(B)** Distancia de los fármacos/compuestos candidatos priorizados para reposicionamiento en endometriosis ($P = 0,01$).

5. Evaluación de la seguridad de los fármacos/compuestos candidatos priorizados para reposicionamiento en endometriosis

Con el objetivo de analizar la seguridad de los candidatos priorizados mediante el modelo basado en farmacología de sistemas, se extrajo la información relativa al número y gravedad de los efectos secundarios de cada uno de los fármacos/compuestos, mediante la revisión manual de las etiquetas comerciales de los medicamentos en la AEMPS (**Tabla 7**).

Tabla 7. Número y gravedad de los efectos secundarios producidos por los fármacos/compuestos candidatos priorizados para reposicionamiento en endometriosis. El color verde indica poca gravedad, el naranja gravedad moderada y el rojo gravedad alta.

Fármaco/Compuesto	Nº efectos secundarios	Gravedad
Cobre	n/d	-
Resveratrol	n/d	-
Adenina	n/d	-

Glutación	n/d	-
NADH	n/d	-
Zinc	n/d	-
Ácido cítrico	22	
Fostamatinib	34	
Aspirina	54	
Tretinoína	57	
Carvedilol	74	
Trióxido de arsénico	81	
Regorafenib	83	
Sorafenib	102	
Carfilzomib	166	
Dasatinib	214	

n/d, no disponible

Como se puede observar en la tabla, compuestos como cobre, resveratrol, adenina, glutación, NADH y zinc no presentaron efectos secundarios descritos, por lo que se consideraron los más seguros. Por otro lado, y como cabría esperar, aquellos fármacos indicados actualmente para el tratamiento de cáncer presentaron mayor cantidad y gravedad de efectos secundarios.

Además de evaluar los efectos secundarios, se estudiaron las variantes farmacogenéticas asociadas a una diferente respuesta a fármacos en la población que podrían conllevar una variación en la eficacia o toxicidad. Sólo se encontraron variantes farmacogenéticas en tres (dasatinib, carvedilol y sorafenib) de los dieciséis candidatos priorizados. Sorafenib fue el fármaco candidato con mayor número de variantes farmacogenéticas asociadas (19), las cuales estaban asociadas a doce genes diferentes. Once

de las variantes estaban asociadas a toxicidad, mientras que diez de ellas estaban asociadas a la reducción de eficacia del tratamiento (existen variantes que afectan tanto a la eficacia como a la toxicidad). Los genes *ABCG2*, *VEGFA* y *KDR* fueron aquellos con más variantes genéticas relacionadas con la respuesta a fármacos (**Tabla 8**).

Tabla 8. Variantes farmacogenéticas asociadas a variación en la respuesta a fármacos en la población. Se muestra el nombre del fármaco candidato priorizado, el número de variantes farmacogenéticas, los genes asociados a las variantes farmacogenéticas, el nº de variantes que producen toxicidad y el nº de variantes que influyen en la eficacia.

Fármaco	Nº variantes	Genes	Toxicidad	Eficacia
Dasatinib	5	1	0	0
Carvedilol	6	4	0	2
Sorafenib	19	12	11	10

Finalmente, para evaluar la seguridad de los fármacos/compuestos candidatos en combinación, se estudiaron las interacciones fármaco-fármaco entre los mismos. Se encontraron interacciones fármaco-fármaco entre alguno de los candidatos para once de los dieciséis priorizados. El trióxido de arsénico mostró la mayor cantidad de interacciones con otros fármacos candidatos (8), de las cuales cuatro de ellas dan lugar a toxicidad (sorafenib, tretinoína, carfilzomib y fostamatinib). No se hallaron interacciones fármaco-fármaco para los siguientes fármacos o compuestos: cobre, zinc, NADH, ácido cítrico y glutatión (**Figura 33**).

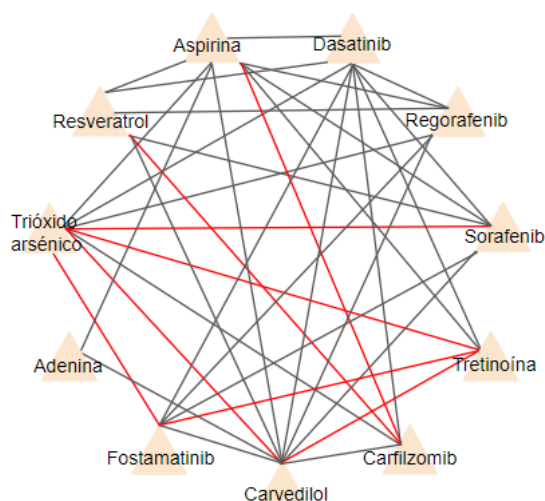


Figura 33. Red de interacción fármaco-fármaco de los fármacos/compuestos candidatos priorizados. Los triángulos representan fármacos/compuestos candidatos. Las aristas grises son interacciones fármaco-fármaco que dan lugar a una variación en los parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos. Las aristas rojas son interacciones fármaco-fármaco que dan lugar a toxicidad.

6. Validación en la literatura: mecanismos de acción de los fármacos/compuestos candidatos priorizados para reposicionamiento en endometriosis

Con el fin de validar las predicciones realizadas por el modelo molecular basado en farmacología de sistemas, se realizó una revisión en la literatura de los compuestos candidatos y su posible implicación en el tratamiento de la endometriosis. Diez de los candidatos tenían algún estudio relacionado directamente con su efectividad en el tratamiento de la endometriosis o la infertilidad (resveratrol, glutatión, zinc, tretinoína, NADH, aspirina, regorafenib, sorafenib, fostamatinib y cobre) (**Tabla Suplementaria 1**).

Por otro lado, seis de los compuestos candidatos priorizados (trióxido de arsénico, dasatinib, carvedilol, adenina, ácido cítrico y carfilzomib) no tenían ninguna referencia en la literatura que relacionara directamente a los mismos con el tratamiento de la endometriosis. Sin embargo, en algunos casos, tenían alguna indicación para el tratamiento de alguna otra enfermedad uterina o endometrial. Concretamente, trióxido de arsénico (Bae-Jump et al., 2008; C. Zhou et al., 2007), dasatinib (Takiguchi et al., 2017) y carfilzomib (Y. Zhou et al., 2016) han sido evaluados con resultados positivos para el tratamiento de cáncer de endometrio o de útero según la revisión en la literatura.

7. Validación *in vitro* de fármacos/compuestos candidatos en una línea celular de endometriosis

Tras priorizar los 16 compuestos candidatos para el tratamiento de la endometriosis, se procedió a validar experimentalmente aquellos con menos efectos secundarios (adenina, NADH, zinc, cobre, glutatión y resveratrol). Con el objetivo de identificar la dosis adecuada a utilizar de cada compuesto, se realizó un ensayo de viabilidad en las HEEC utilizando diferentes concentraciones de cada compuesto. El rango de concentración utilizado en cada compuesto fue seleccionado en base a estudios en los que se habían probado dichos compuestos en cultivos celulares. En los casos del zinc y el cobre se encontró que mostraban una reducción significativa de la viabilidad de las HEEC a determinada concentración ($P < 0,05$). En el zinc en particular, la concentración a la que se produjo una disminución significativa de la viabilidad celular fue a partir de 200 μM ($P = 1,6 \times 10^{-4}$). El cobre mostró una reducción significativa de la viabilidad celular a una concentración de 50 μM ($P = 5,48 \times 10^{-4}$), mientras que en el resveratrol esta reducción se vio a partir de una concentración de 200 μM ($P = 0,0018$) (**Figura 34**).

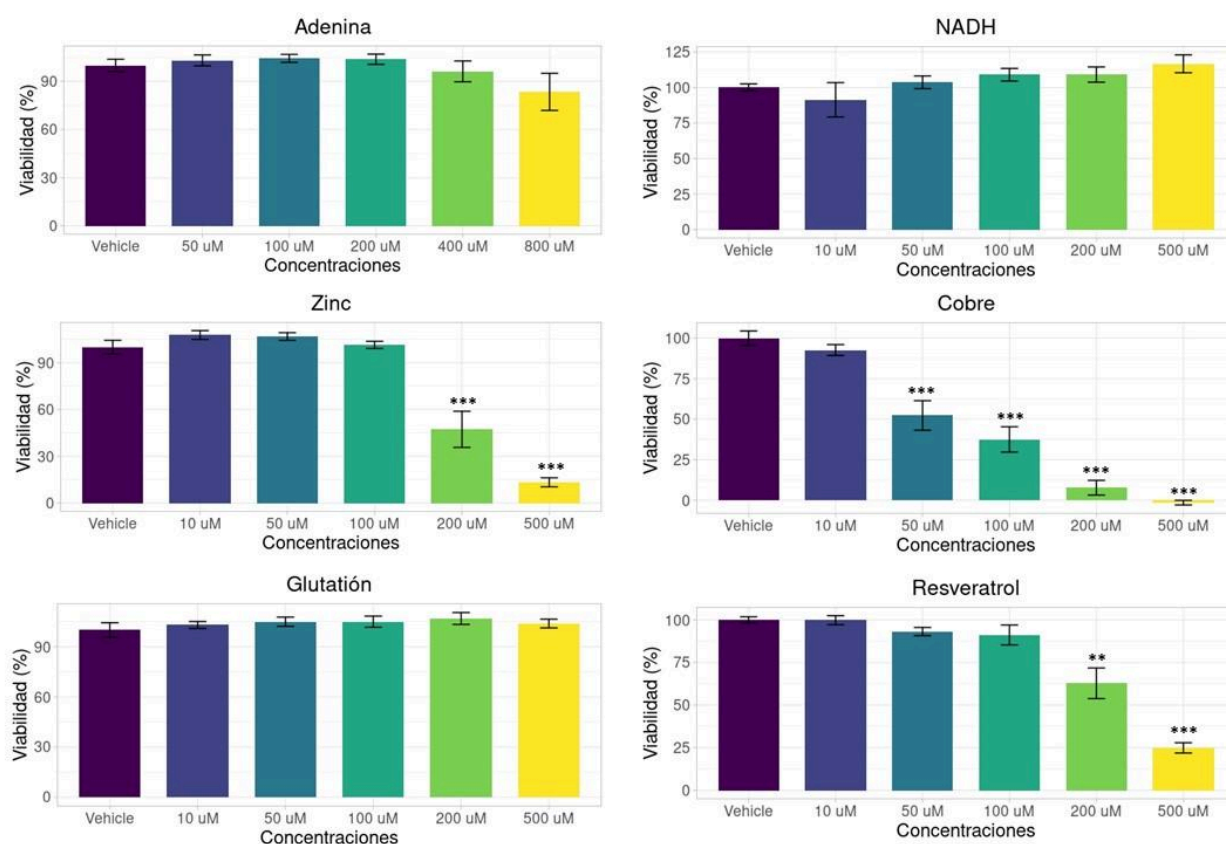


Figura 34. Ensayo de dosis de los compuestos candidatos. Se muestra el porcentaje de viabilidad celular en HEEC tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos candidatos (adenina, NADH, zinc, cobre,

glutación y resveratrol) con respecto a las células cultivadas con el vehículo (control). Las barras de error representan el error estándar (SE).

SE, standard error (error estándar); **, $P < 0,01$ (test t-Student); ***, $P < 0,001$ (test t-Student)

En el caso del resveratrol, debido a que su efectividad en endometriosis ha sido validada experimentalmente *in vitro* en muchos estudios, se decidió realizar una prueba de concepto a una dosis de 100 μM (dosis máxima no tóxica para células endometriales sanas), observando una reducción significativa en el crecimiento celular de las 12Z ($P = 0,004$) (Figura 35).

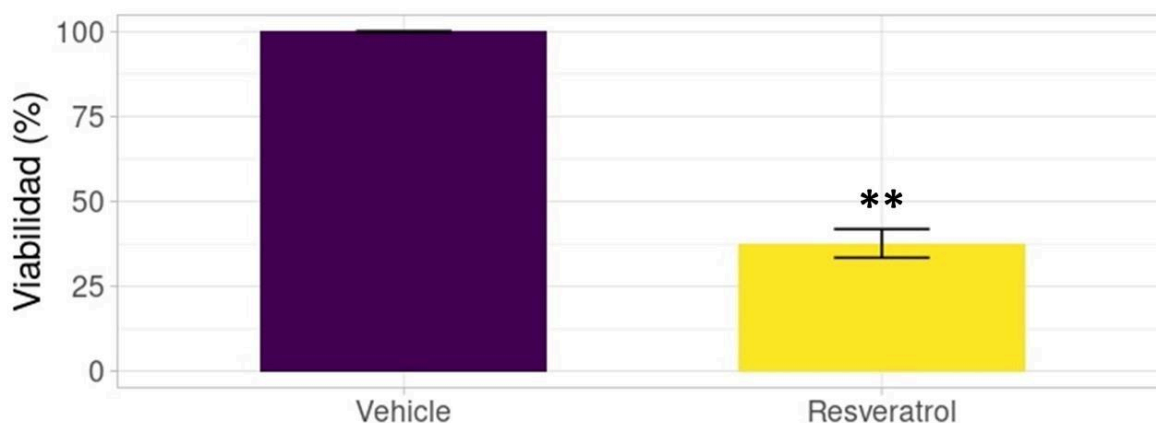


Figura 35. Efecto de viabilidad celular en la línea celular de endometriosis 12Z para el resveratrol. Se muestra el porcentaje de viabilidad de células tratadas con resveratrol a una concentración de 100 μM normalizado con respecto a las células tratadas con el vehículo (control). Las barras de error representan el error estándar (SE).

SE, standard error (error estándar); **, $P < 0,01$ (test t-Student)

En el caso del cobre y el zinc, se decidió probar un rango de dosis comprendido entre la concentración máxima que no produce un efecto tóxico sobre las HEEC y la dosis mínima que reduce la viabilidad de dichas células. Debido a las nuevas concentraciones incluidas, este ensayo se realizó tanto en HEEC como en células 12Z. Se encontró que el zinc redujo la viabilidad de las HEEC a partir de una concentración de 175 μM ($P = 0,012$) y en las 12Z a partir de una concentración de 175 μM ($P = 8,0 \times 10^{-4}$). Además, también se observó que a partir de 175 μM las células 12Z eran más sensibles al tratamiento con zinc que las células HEEC ($P = 1,2 \times 10^{-4}$). El cobre redujo significativamente la viabilidad de las HEEC a una concentración de 20 μM ($P = 1,7 \times 10^{-5}$), al igual que en las 12Z ($P = 0,002$). A partir de una concentración de 40 μM las células 12Z mostraron una sensibilidad mayor a la aplicación de cobre con respecto a las HEEC ($P = 0,004$) (Figura 36).

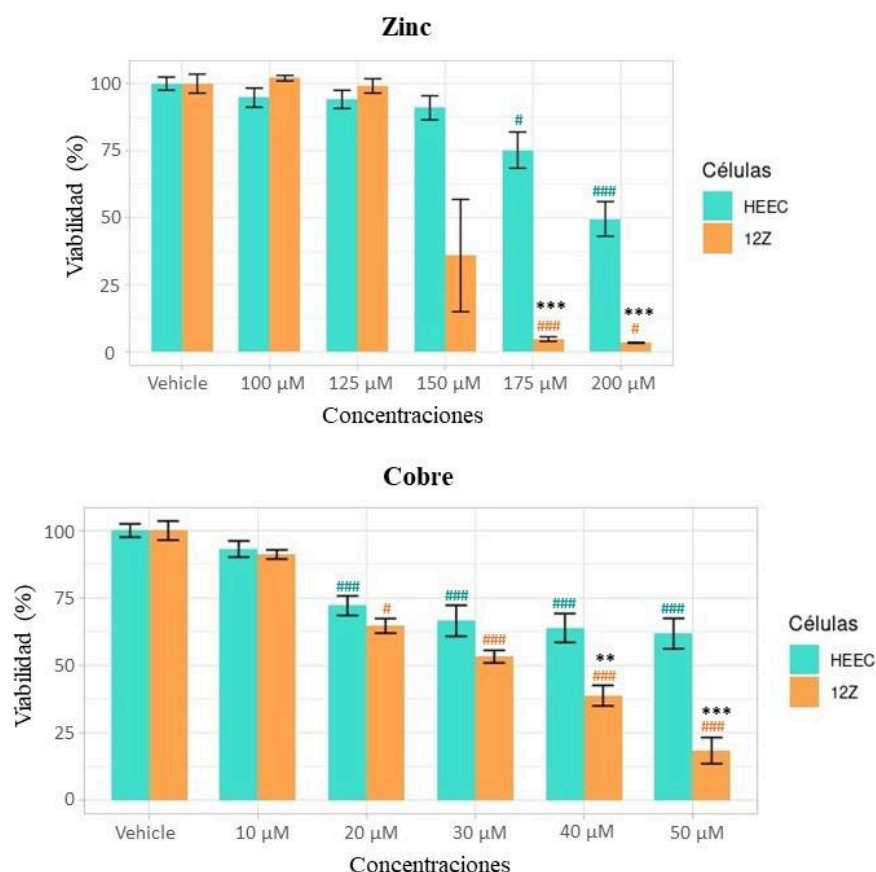


Figura 36. Efecto de viabilidad celular en HEEC y en la línea celular de endometriosis (12Z) para el zinc y el cobre. Se muestra el porcentaje de viabilidad de las células tratadas con diferentes concentraciones de zinc (100-200 μM) y cobre (10-50 μM) normalizado con respecto a las células cultivadas con el vehículo (control). Los asteriscos (*) representan la significatividad de la comparación entre las células 12Z tratadas y las HEEC tratadas. Las almohadillas (#) azules representan la significatividad de la comparación entre las HEEC tratadas y las HEEC cultivadas con el vehículo. Las almohadillas naranjas (#) representan la significatividad entre las células 12Z tratadas y las células 12Z cultivadas con el vehículo. Las barras de error representan el error estándar (SE).

HEEC, human endometrial epithelial cells; SE, standard error (error estándar); */#, $P < 0,05$ (test t-Student); **/##, $P < 0,01$ (test t-Student), ***/###, $P < 0,001$ (test t-Student)

En el caso de NADH, adenina y glutatión, se decidió emplear la dosis máxima para evaluar el efecto en las 12Z, ya que no se observó ningún efecto perjudicial sobre las HEEC a dicha dosis (**Figura 34**). En este caso, el glutatión y el NADH mostraron un aumento significativo de la proliferación celular en las 12Z ($P = 0,043$ y $P = 0,002$ respectivamente), mientras que para la adenina no se observaron diferencias significativas, pero se apreció una tendencia a la reducción de la viabilidad celular ($P = 0,052$) (**Figura 38**).

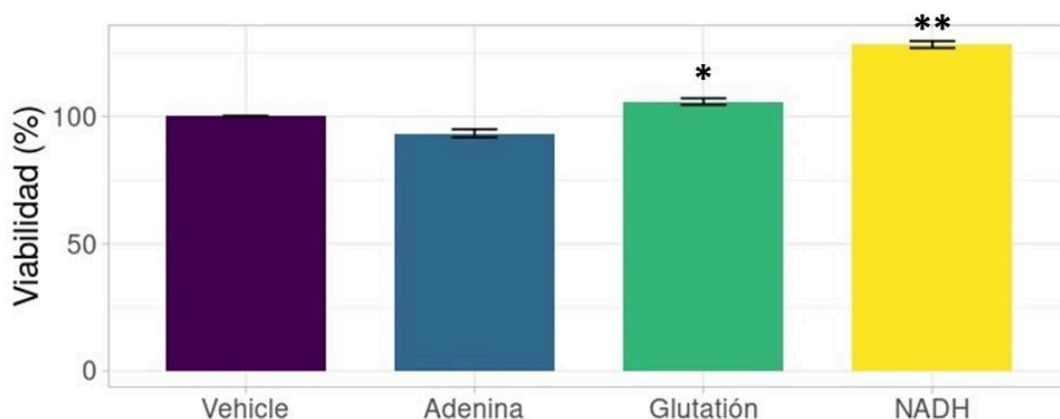


Figura 38. Efecto de viabilidad celular en la línea celular de endometriosis (12Z) para la adenina, glutatión y NADH. Se muestra el porcentaje de viabilidad de las células 12Z tratadas con las máximas dosis de adenina (800 μ M), glutatión (500 μ M) y NADH (500 μ M) normalizado con respecto a las células cultivadas con el vehículo (control). Las barras de error representan el error estándar (SE).

SE, standard error (error estándar); *, $P < 0,05$ (test t-Student); **, $P < 0,01$ (test t-Student)

En este contexto, se decidió aumentar la concentración de NADH y glutatión (debido a la baja solubilidad de la adenina, no fue posible realizar un ensayo con dosis más elevadas para evaluar su efecto en las 12Z) para analizar de qué modo podrían afectar a la viabilidad de las 12Z concentraciones crecientes de estos compuestos. En el caso del NADH se observó un crecimiento celular significativo dependiente de dosis a partir de 500 μ M ($P = 0,013$) en la línea celular de endometriosis (12Z). Asimismo, el glutatión también aumentó significativamente el crecimiento celular en las 12Z a partir de una concentración de 1.000 μ M ($P = 0,017$) (**Figura 39**).

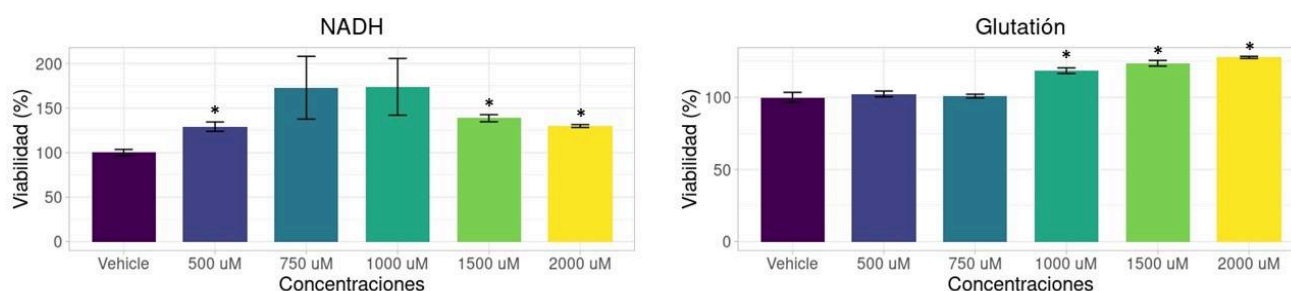


Figura 39. Efecto de viabilidad celular en la línea celular de endometriosis 12Z para el NADH y el glutatión. Se muestra el porcentaje de viabilidad de las células 12Z tratadas con diferentes concentraciones de NADH (500-2.000 μ M) y glutatión (500-2.000 μ M) normalizado con respecto a las células cultivadas con el vehículo (control). Las barras de error representan el error estándar (SE).

SE, standard error (error estándar); *, $P < 0,05$ (test t-Student)

8. Mecanismos de acción de los fármacos/compuestos candidatos

Los compuestos candidatos priorizados presentan diferentes mecanismos de acción relacionados con los procesos moleculares que dan lugar al desarrollo y progresión de la endometriosis y la infertilidad asociada (**Figura 40**).

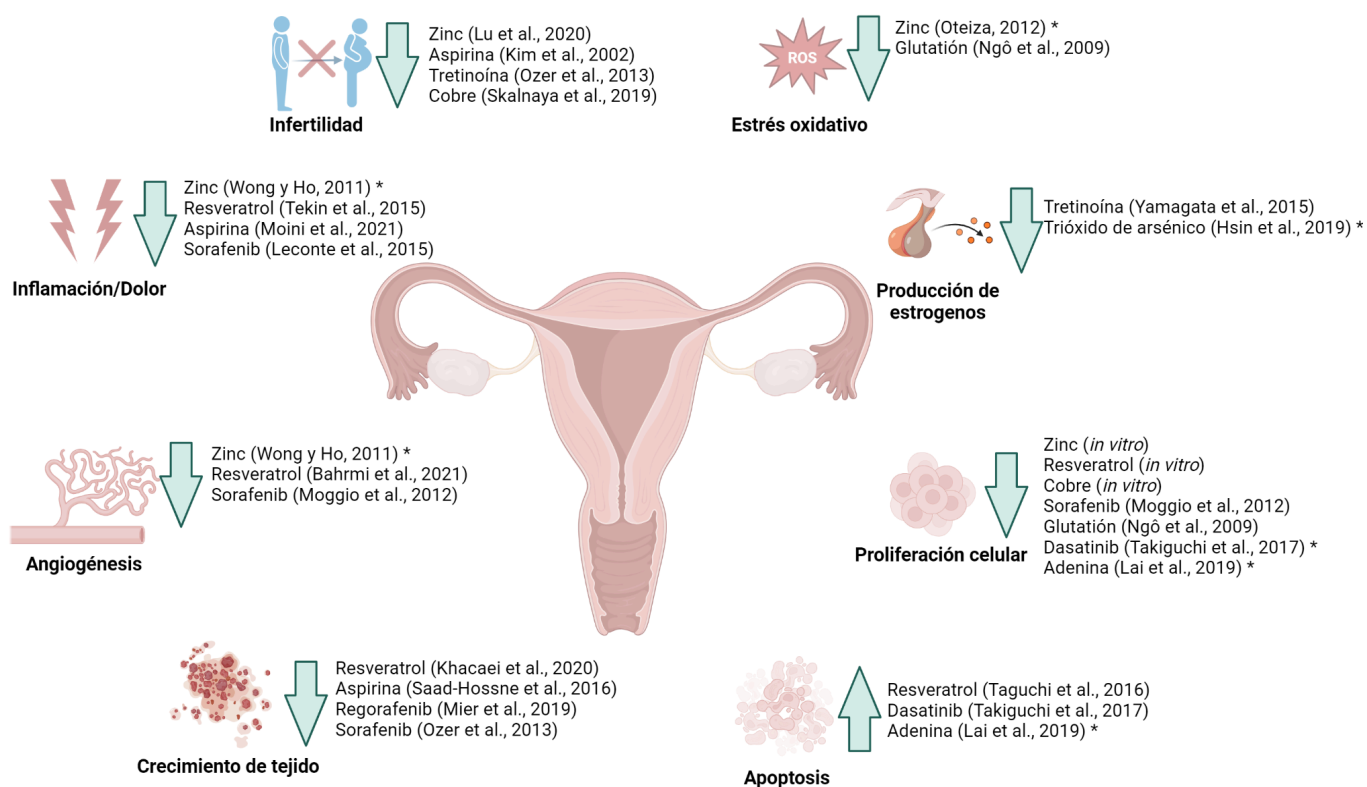
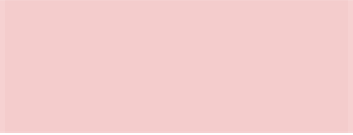


Figura 40. Mecanismos de acción de los compuestos candidatos para el tratamiento de la endometriosis y/o la infertilidad asociada. En concordancia con la búsqueda en la literatura y la validación experimental *in vitro* se muestran los diferentes modos de acción de los compuestos candidatos en algunos de los procesos moleculares o biológicos relacionados con la endometriosis. Los compuestos marcados con ‘*’ han sido evaluados en otros tejidos no endometriales para los mecanismos de acción representados. *Creado con BioRender.com*

Discusión

“La base más fructífera para el descubrimiento de un nuevo fármaco es comenzar con un fármaco antiguo.”

- *Sir James Black (Premio Nobel, 1988)*



El estudio realizado en la presente Tesis Doctoral aborda por primera vez el tratamiento de la endometriosis mediante un enfoque basado en farmacología de sistemas, en el que se integra información de diferentes fuentes para proponer nuevos compuestos candidatos para su reposicionamiento en dicha enfermedad. A diferencia de otros trabajos previos (Bhat et al., 2019; Burney et al., 2007; Crispi et al., 2013; Hever et al., 2007; Hull et al., 2008; Zhao et al., 2018), que se limitan a la búsqueda de biomarcadores importantes para la enfermedad, el presente estudio va más allá, no sólo evaluando la importancia de dichos marcadores, sino también asociándolos a la búsqueda de fármacos o compuestos ya aprobados en el mercado para proponer tratamientos más efectivos a nivel molecular y con menores efectos secundarios que los fármacos actuales. En contraposición a los métodos clásicos, este tipo de enfoque podría ahorrar tiempo y costes, debido a que el mismo permite realizar hipótesis dirigidas de un modo racional, teniendo en cuenta las bases moleculares que dan lugar a la aparición de la enfermedad y su relación con los mecanismos de acción de los diferentes compuestos. La metodología integrativa empleada para la selección de genes permite obtener unos resultados más robustos que los derivados de estudios independientes. Asimismo, el empleo de un Interactoma Humano validado experimentalmente refuerza los resultados obtenidos, en comparación con aquellos estudios en los que se emplean redes de IPP derivadas de predicciones. Finalmente, este es el primer estudio realizado en el que se compara la eficacia a nivel molecular entre los fármacos actuales empleados para el tratamiento de la endometriosis y los compuestos priorizados mediante el presente modelo de priorización.

El estudio de la expresión diferencial de genes entre los diferentes tejidos de pacientes con endometriosis (ectópico/eutópico) y el control y la búsqueda de biomarcadores genéticos realizados en la presente tesis revela que la endometriosis y la infertilidad asociada se caracterizan por el deficiente funcionamiento de múltiples genes, hecho que concuerda con estudios previos realizados (Bhat et al., 2019; Burney et al., 2007; Crispi et al., 2013; Hever et al., 2007; Hull et al., 2008; Zhao et al., 2018). La integración de experimentos independientes de expresión génica ha sido empleada previamente en otros estudios, demostrando obtener unos resultados más robustos que los experimentos realizados de manera independiente, corrigiendo el efecto tanda (*batch effect*) asociado a cada uno de ellos (Tajti et al., 2020). Además, esto permite aumentar el tamaño muestral con respecto a estudios independientes y, por lo tanto, detectar diferencias más sutiles en la expresión génica.

En este contexto, la posterior integración de estos genes en el Interactoma Humano nos permite analizar las relaciones a nivel molecular entre los mismos. A pesar de que unas de las principales limitaciones del Interactoma Humano son que todavía se estima incompleto y que no se han comprobado experimentalmente si las IPP se producen realmente en tejido endometrial, el nivel de detalle que ofrece en la actualidad, y la fiabilidad de los datos disponibles en cuanto a las interacciones entre las diferentes proteínas humanas, ha sido aprovechado con éxito por múltiples estudios para otras enfermedades complejas como el cáncer (Gulati et al., 2013). De hecho, el Interactoma Humano muestra un sesgo aparente hacia el estudio de interacciones entre proteínas relacionadas con las enfermedades más estudiadas, como la mencionada anteriormente (Kar et al., 2009). A pesar de estas limitaciones, otras múltiples enfermedades complejas como la celiaquía (Zamanian Azodi et al., 2016), el asma (Hwang et al., 2008), el infarto de miocardio (Guo et al., 2021; Song et al., 2022), la esclerosis múltiple (Safari-Alighiarloo et al., 2016) o enfermedades infecciosas como el relativamente reciente COVID-19 (Morselli et al., 2021), por citar algunos ejemplos, han sido estudiadas bajo este tipo de aproximaciones. Uno de los trabajos más reveladores de la importancia de este tipo de redes fue el realizado por el grupo de László Barabási, uno de los pioneros en el uso del Interactoma Humano, que dio nombre a la disciplina *network medicine* (Barabási et al., 2011). Gracias a la integración de genes de diferentes enfermedades complejas, demostró la relación a nivel genético entre las mismas, así como las comorbilidades asociadas.

En lo que respecta a la endometriosis, también existen trabajos previos (Idrissi et al., 2022; Katiyar et al., 2018; Liu et al., 2015; Xiao et al., 2017; Yu et al., 2021) en los que se emplea el Interactoma Humano para diferentes propósitos o aproximaciones al de la presente Tesis Doctoral. Algunos de estos han empleado las redes de IPP para predecir nuevos biomarcadores para la endometriosis mediante el uso de parámetros topológicos de red como el *degree* o la *betweenness centrality* o el análisis de módulos de genes relacionados con la enfermedad y posteriormente fueron validados, en algunos casos. No obstante, algunas de las limitaciones de estos estudios estriban en el uso de redes de IPP derivadas de predicciones, lo que podría conllevar la obtención de conclusiones menos acertadas o sesgadas en comparación con aquellos en los que se emplea un Interactoma Humano validado experimentalmente. Por ello, una de las fortalezas de este estudio es el uso de un Interactoma Humano con una alta evidencia científica, lo que permite asegurar que las conclusiones obtenidas son robustas en tanto que proceden de una fuente fiable de información. En otros

casos se emplean algoritmos para agrupar diferentes conjuntos de genes de enfermedad con el fin de evaluar su comportamiento en conjunto en el Interactoma Humano. No obstante, dependiendo del algoritmo empleado para detectar estos módulos de genes, los resultados obtenidos son diferentes, por lo que podrían obtenerse conclusiones diferentes (Emmons et al., 2016).

Otra de las fortalezas de la presente Tesis Doctoral consiste en la búsqueda de manera robusta de genes relacionados con endometriosis mediante la integración de diferentes estudios de expresión diferencial de genes de diferentes tejidos endometriales (ectópico, eutópico y endometrio control) y en el análisis de la relación de estos genes con el componente genético de la enfermedad. Además de los trabajos mencionados anteriormente, existe otro precedente en la integración de diferentes estudios de expresión génica realizada por Chen y colaboradores (2020), en la que combinan tres estudios procedentes de la base de datos GEO para llevar a cabo un análisis de expresión diferencial de genes y un análisis de redes moleculares basadas en el Interactoma Humano para predecir dianas moleculares importantes para la endometriosis y que, posteriormente, fueron validadas experimentalmente mediante inmunohistoquímica. Sin embargo, no se incluye información acerca de los potenciales fármacos dirigidos a esas dianas moleculares. Además, la mayoría de estudios mencionados anteriormente emplean redes IPP que no han sido experimentalmente validadas para llevar a cabo sus estudios, por lo que las conclusiones obtenidas podrían estar sesgadas. Por otro lado, el Interactoma Humano empleado ha sido validado por diferentes métodos experimentales ortogonales, lo que proporciona una alta fiabilidad relativa a los resultados obtenidos. Adicionalmente, el análisis de la propiedad *scale-free* del Interactoma Humano empleado, con un $R^2 = 0,919$, y de la posterior red de endometriosis derivada de la misma tras la integración de genes de enfermedad, con un $R^2 = 0,911$, indica que se asemejan a redes biológicas reales y no a redes aleatorias, hecho que refuerza los posteriores análisis realizados sobre las mismas. En este contexto, la presente Tesis Doctoral es el primer trabajo que estudia las relaciones moleculares entre el componente genético de la endometriosis y la influencia del ambiente sobre la expresión génica. Este análisis reveló una estrecha relación entre los genes involucrados en el desarrollo y progresión de la endometriosis (ectópico vs eutópico) y los genes asociados a la infertilidad relacionada con la enfermedad (eutópico vs control), por lo que se puede concluir que tienen mecanismos moleculares en común. No obstante, este mismo análisis reveló la falta de relación significativa entre los genes relacionados con el componente puramente genético de la endometriosis (derivados de GWAS) y los genes

obtenidos mediante el análisis de la expresión génica. Sin embargo, no es posible confirmar si este hecho se debe a que el Interactoma Humano empleado está incompleto (solamente mapearon un 34% de los genes) o a que no existe realmente esta relación a nivel molecular, situación que se resolverá a medida que se complete el Interactoma Humano. De acuerdo con la hipótesis local que establece que los genes de una misma enfermedad tienden a agruparse en el Interactoma Humano (Barabási et al., 2011; Goh et al., 2007; Oti et al., 2006; X. Wang et al., 2011), se decidió realizar la red de endometriosis con los genes derivados de expresión diferencial (influencia del ambiente sobre la expresión genética) que mostraban una estrecha relación, excluyendo de análisis posteriores a aquellos genes derivados de GWAS, ya que la falta de IPP entre los mismos no permitiría obtener una red conectada (ni *scale-free*) con la que realizar los análisis pertinentes de la presente Tesis.

Una de las novedades de este trabajo con respecto a los descritos anteriormente es la integración entre la información sobre los fármacos/compuestos y sus dianas moleculares y la información de los genes de enfermedad (biomarcadores), lo que aporta un valor añadido para establecer hipótesis racionales acerca de los posibles tratamientos para la progresión de la enfermedad y la infertilidad asociada. Existen algunos estudios para el tratamiento de la endometriosis, basados en farmacología de sistemas, en los que se integra información acerca de productos naturales y sus dianas en redes moleculares (Y. Chen et al., 2018; Wei et al., 2019). No obstante, a diferencia de la presente Tesis Doctoral, dichos estudios se centran en un solo compuesto natural en lugar de estudiar de modo sistemático todos los fármacos aprobados en el mercado mediante esta aproximación.

La inclusión de todos los fármacos y compuestos aprobados permite comparar su eficacia a nivel molecular con los actuales tratamientos para la endometriosis y la posibilidad de estudiar las relaciones a nivel molecular con la enfermedad, con el fin de predecir el potencial reposicionamiento de los mismos para su tratamiento. Es conocido el hecho de que, a pesar de que en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento a nivel molecular de la etiopatogénesis de la endometriosis, este conocimiento no se ha traducido de un modo efectivo en tratamientos más efectivos que los que había hace unas décadas. La mayoría de los empleados actualmente en la rutina clínica son paliativos, y una de las limitaciones de los fármacos disponibles es que tienen modos de acción similares contra la enfermedad. A pesar de la obvia, después de múltiples estudios que lo avalan, de que determinadas condiciones como la sobreproducción de estrógenos condicionan el desarrollo y

progreso de la endometriosis, los inhibidores de la aromatasa (enzima fundamental en la biosíntesis de estrógenos) no son suficientes para revertir la enfermedad por completo (Garzon et al., 2020). Esto se explica, en parte, por el hecho de que la endometriosis es una enfermedad en la que existen numerosos procesos moleculares desregulados más allá de la sobreproducción de estrógenos (Samimi et al., 2019). Existen otros tratamientos con diferentes modos de acción que se están estudiando en la actualidad, como fármacos antiangiogénicos, inmunomoduladores, estatinas o inhibidores de la histona deacetilasa (Bedaiwy et al., 2017; Clemenza et al., 2018). La mayoría de los tratamientos disponibles tienen modos de acción similares. Tras realizar la revisión de las principales guías de reproducción, tanto nacionales como internacionales, se observó que existen 44 fármacos disponibles en la rutina clínica, los cuales pueden ser divididos a su vez en tratamientos hormonales y no hormonales, que son prescritos para el tratamiento del dolor asociado a la enfermedad o para la infertilidad asociada. Entre los tratamientos hormonales, destacan los anticonceptivos orales y los agonistas de la hormona GnRH (GnRH-a), los cuales interfieren con la ovulación de las pacientes y tienen una gran cantidad de efectos indeseados. Otro tipo de tratamientos hormonales que se emplean son los SERM y SPRM. Se trata de agentes que tiene efectos de agonista o antagonista sobre los receptores de estrógenos o progesterona en función del tejido sobre el que actúan. Algunos estudios muestran la efectividad de estos en la reducción del tamaño de las lesiones endometriósicas y el dolor pélvico (Suardika & Astawa, 2018), aunque la mayoría de estudios se han llevado a cabo en modelos animales y otros estudios muestran resultados contradictorios en cuanto a su efectividad. Sin embargo, el empleo de estos fármacos puede conllevar efectos secundarios indeseados, como el aumento del cáncer de endometrio (Tamoxifeno) o una enfermedad tromboembólica, al igual que los estrógenos en el caso de los SERM (Pérez Edo, 2004), o efectos negativos en la ovulación en el caso de los SPRM (Keller et al., 2016).

Una de las ventajas que suponen las redes moleculares y la farmacología de sistemas es que nos permite integrar a nivel sistémico información sobre los fármacos o compuestos y sus dianas moleculares por un lado y los genes de enfermedad por otro lado, para visualizar y analizar las relaciones a nivel molecular que se producen, pudiendo así establecer hipótesis dirigidas al reposicionamiento racional de fármacos. En este contexto, uno de los resultados de esta Tesis Doctoral muestra una longitud significativamente más corta que la esperada por azar en las dianas moleculares de los fármacos/compuestos candidatos en conjunto con respecto a los genes de endometriosis, por lo que podrían ser susceptibles de ser

reposicionados para el tratamiento de la endometriosis. Contrariamente a este hecho, los fármacos de uso actual en clínica, en conjunto, muestran unas distancias más largas de lo esperado por azar a los genes de endometriosis en el Interactoma Humano, por lo que, a nivel comparativo, se podría proponer que los candidatos seleccionados mediante el presente modelo de priorización tendrían una relación molecular más estrecha con el desarrollo y progresión de la endometriosis y la infertilidad asociada que los tratamientos actuales, hecho que concuerda con que algunos de los actuales son paliativos para el tratamiento de la enfermedad.

La revisión en la literatura de los fármacos/compuestos candidatos priorizados puede arrojar luz sobre los mecanismos moleculares, por los que los mismos podrían ser efectivos para el tratamiento de la endometriosis y la infertilidad asociada. En este contexto, diez de los candidatos priorizados ya habían sido estudiados para el tratamiento de la endometriosis o su relación a nivel molecular, lo que refuerza las conclusiones obtenidas a partir del modelo molecular desarrollado en este estudio. Uno de los compuestos candidatos priorizados por el modelo molecular es el **resveratrol**, antioxidante natural con múltiples propiedades y sin efectos secundarios descritos. Existen diversos estudios en los que se analiza la efectividad de este compuesto para el tratamiento de la endometriosis mediante diversos mecanismos de acción. En concordancia con el modelo de priorización, el resveratrol presenta múltiples dianas moleculares relacionadas con la endometriosis, lo que podría explicar la diversidad de mecanismos de acción por los que este compuesto podría ser interesante para el tratamiento de la enfermedad. Entre estos mecanismos de acción, el resveratrol presenta un efecto inhibitorio del crecimiento de tejido endometriósico (Ricci et al., 2013), modulando la expresión de genes relacionados con la inflamación y la angiogénesis (Bahrami et al., 2021; Bayoglu et al., 2015; Kodarahmian et al., 2019), o mecanismos como la apoptosis (Taguchi et al., 2016) o el estrés oxidativo (Yavuz et al., 2014), los cuales ya se habían relacionado con el desarrollo y progreso de la enfermedad. Además, un estudio *in vivo* en humanos sugiere que la combinación del resveratrol con anticonceptivos orales reduce significativamente el dolor en mujeres con endometriosis (Maia et al., 2012). También se ha sugerido que podría mejorar el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis durante el periodo de la ventana de implantación mediante la modulación de *VEGF* y *TNF- α* (Khodarahmian et al., 2021). Otro de los posibles mecanismos de acción de este compuesto que da lugar a la inhibición de la proliferación celular puede explicarse por la inhibición de *AHR* por parte del resveratrol. Se trata de una diana molecular con una elevada expresión en el endometrio

ectópico de pacientes con endometriosis, de acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de expresión diferencial de genes desarrollado en la presente Tesis Doctoral. En condiciones normales, este gen es importante para regular la proliferación celular y la apoptosis. La activación de *AHR* da lugar a la transcripción de los receptores de estrógenos en endometrio (*ESR1* y *ESR2*) y, como consecuencia, se produce un aumento de la proliferación celular (De Pascali et al., 2021). Por otro lado, *AHR* activa el gen *CYP1B1* (también sobreexpresado en endometriosis) en la misma ruta molecular, dando como resultado una sobreactivación de los receptores de estrógenos (Piccinato et al., 2016) y una inhibición de la proteína DAPK1 (Mitsui et al., 2015), que, a su vez, inhibe la apoptosis celular como consecuencia (Singh et al., 2016). Por tanto, la inhibición de *AHR* y *CYP1B1* por parte del resveratrol podría explicar el mecanismo de acción de este compuesto en lo referente a la proliferación observada en el modelo celular *in vitro*. Otra de las dianas moleculares del resveratrol, *ITGA5*, una integrina que participa en la adhesión y señalización mediada por la superficie celular, sobreexpresada en endometriosis, podría explicar el efecto de este compuesto en procesos celulares como la adhesión, la migración o la invasión celular, procesos desregulados en endometriosis. La inactivación de esta diana molecular da como resultado la inhibición de los procesos moleculares descritos (Xiao et al., 2021). Como prueba de concepto que apoya las predicciones realizadas por el modelo de endometriosis, el resveratrol mostró un efecto beneficioso para la endometriosis, reduciendo significativamente la viabilidad de la línea celular de endometriosis inmortalizada (12Z), en concordancia con estudios previos. Todo ello avala el reposicionamiento de este compuesto para el tratamiento de la endometriosis. Otro de los compuestos candidatos priorizados, el **zinc**, empleado actualmente para el tratamiento de algunas afecciones como el retraso del crecimiento, también ha sido relacionado con la endometriosis y la infertilidad. Diversos estudios muestran la reducción de los niveles de zinc en sangre en mujeres con infertilidad con respecto a las mujeres sanas (Lu et al., 2020). Del mismo modo, se ha observado que mujeres infértiles con endometriosis presentan niveles más bajos de zinc en sangre que mujeres infértiles sin endometriosis (Lai et al., 2017), lo que apunta a una posible implicación del zinc en el desarrollo de la endometriosis. Por otro lado, algunos estudios han hallado niveles mayores de zinc en líquido folicular en mujeres que quedan embarazadas con respecto a las que no lo logran (Singh et al., 2013), lo que sugiere que el zinc podría tener un papel importante en fertilidad. Otro estudio realizado por Mier-Cabrera y colaboradores (2009) demostró que las mujeres con endometriosis tenían una dieta más baja en zinc que aquellas que no desarrollan la enfermedad. Todos estos indicios apuntan a la posibilidad de realizar

ensayos clínicos en un futuro para probar la efectividad del zinc en el tratamiento de la endometriosis y/o la infertilidad asociada. De hecho, existe un ensayo clínico con 99 pacientes con endometriosis (NCT02437175) en el que se estudia el efecto de diferentes elementos traza como el zinc en el tratamiento del dolor asociado a la endometriosis. No obstante, en este estudio sólo se evalúa el posible rol del zinc en el tratamiento del dolor, por lo que sería interesante realizar otros estudios en los que se contemple su papel en el tratamiento de la infertilidad asociada a la endometriosis, así como en otros procesos biológicos relacionados con la enfermedad. De acuerdo al modelo de priorización realizado, el zinc presenta cinco dianas moleculares relacionadas con la infertilidad y 21 con el desarrollo y progresión de la enfermedad, lo que, junto con los resultados sobre la proliferación celular *in vitro* en la línea celular 12Z, refuerza su posible uso para el tratamiento de ambas afecciones. Otra opción atractiva podría consistir en estudiar el efecto de la combinación de estos compuestos o la combinación con alguno parcialmente efectivo que se emplea actualmente para tratar la endometriosis, con el objetivo de evaluar si existe un efecto sinérgico entre ellos para el tratamiento de la enfermedad y de la infertilidad asociada a la misma. Como muestra el análisis de interacciones fármaco-fármaco entre los compuestos priorizados, no se encontraron interacciones que pudieran comprometer la eficacia o seguridad de la combinación de los mismos. Asimismo, en el análisis de variantes genéticas que pudieran comprometer la eficacia o seguridad sólo se encontró una para el zinc, que podría tenerse en consideración para futuros ensayos clínicos. Con respecto al **cobre**, las variaciones de los niveles de este compuesto en sangre han sido vinculadas con el posible desarrollo de infertilidad por diversos estudios. Para este compuesto no han sido descritos efectos secundarios. Existen dos estudios que muestran unos niveles significativamente reducidos de este compuesto en sangre en mujeres con infertilidad (Soltan & Jenkins, 1983) o en aquellas en las que se produce aborto (Skalnaya et al., 2019), por lo que podría ser interesante ahondar más en su papel en el tratamiento de enfermedades reproductivas. Además, otro estudio llevado a cabo por Mao y colaboradores (2017) halló una relación positiva entre la liberación de cobre mediante un dispositivo intrauterino durante el ciclo menstrual antes de la implantación y la mejora en las tasas de implantación, embarazo químico y embarazo clínico en mujeres con fallos de implantación recurrente. El modelo de priorización indica que el cobre presentaba un total de 40 dianas moleculares relacionadas con la progresión y desarrollo de la endometriosis y 10 vinculadas a la infertilidad asociada. Finalmente, el estudio *in vitro* realizado resalta una implicación de este compuesto en la inhibición del crecimiento celular en el modelo de endometriosis, por lo que sería interesante

evaluar el papel de este compuesto en humanos. En lo referente al **NADH**, otro antioxidante natural sin efectos secundarios descritos, al igual que el resveratrol, sólo existe un estudio que muestra su implicación directa con la endometriosis (Atkins et al., 2019). Dicho estudio mostró unos niveles menores de NADH en mujeres con endometriosis que en mujeres sanas, lo que revelaría un posible papel en el tratamiento de la enfermedad. Es conocido que el NADH es un potente antioxidante (Mier-Cabrera et al., 2009), y el desarrollo de la endometriosis ha sido vinculado a una mayor producción de estrés oxidativo (Scutiero et al., 2017), por lo que podría explicar el mecanismo mediante el cuál el NADH tendría una relación con el desarrollo de la enfermedad. No obstante, sería interesante realizar más estudios que evalúen el papel de este compuesto en el tratamiento de la endometriosis. Los resultados obtenidos mediante los experimentos realizados *in vitro* indican que este compuesto podría no ser efectivo para controlar la proliferación celular en el modelo de endometriosis. Sin embargo, el hecho de que presente una estrecha relación a nivel molecular con la endometriosis, sugiere que podría ser efectivo en la reversión de otros procesos biológicos relacionados con la enfermedad, por lo que sería interesante realizar más estudios para comprobar su papel en los mismos. El **glutathión**, otro antioxidante natural sin efectos secundarios especificados, también ha sido indirectamente relacionado con su posible implicación en el desarrollo de la endometriosis. Un estudio mostró niveles reducidos de glutathión en células de endometrio ectópico en mujeres con endometriosis con respecto al endometrio eutópico en mujeres sanas (Jamali et al., 2019), dando como resultado una situación de estrés oxidativo más elevado. En otro estudio *in vivo*, se demostró la reducción de los endometriomas en pacientes con endometriosis mediante la aplicación de un tratamiento con N-acetilcisteína (precursor directo del glutathión) sin interferir en la ovulación (Porpora, Brunelli, et al., 2013), por lo que podría ser una alternativa a los tratamientos actuales que interfieren en la misma. Al igual que el NADH, este compuesto mostró un aumento en la viabilidad celular en el modelo de endometriosis (línea celular 12Z) *in vitro*, pero sería interesante evaluar el efecto de este compuesto en otros procesos moleculares relacionados con la endometriosis.

El resto de compuestos priorizados por el modelo basado en farmacología de sistemas presentan un mayor número de efectos secundarios con respecto a los descritos anteriormente, por lo que no fueron considerados para su validación *in vitro*. No obstante, también han sido diversos estudios los que han analizado el papel de la **aspirina** en el tratamiento de la endometriosis y el dolor asociado. Se trata de un compuesto con

propiedades analgésicas indicado actualmente para procesos inflamatorios o dolor. A pesar de que en la actualidad se ofrece como opción de tratamiento el uso de fármacos con propiedades analgésicas y antiinflamatorias, el hecho de que este compuesto haya sido priorizado mediante el presente modelo, apunta a que podría ser una alternativa más efectiva que los actuales tratamientos. Un estudio de este compuesto en conejos mostró una reducción significativa de los implantes endometriósicos (Saad-Hossne et al., 2016), lo que sugiere una posible alternativa al uso de los tratamientos actuales. Además, también ha sido demostrado su papel en la mejora significativa del dolor asociado a la enfermedad y la dismenorrea (Moini et al., 2021), uno de los síntomas relacionados con la endometriosis, y en la mejora de las tasas de embarazo y de implantación embrionaria en pacientes con endometriosis (Kim et al., 2002; L. Wang et al., 2021). Por ello, este compuesto podría ser interesante para mejorar tanto el dolor asociado a la enfermedad como la posible infertilidad relacionada con la misma. La **tretinoína**, actualmente indicada para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda, también ha sido estudiada para el tratamiento de la endometriosis con resultados positivos. Un estudio en humanos mostró su papel en la regulación de genes relacionados con la proliferación celular y el metabolismo de estrógenos (Yamagata et al., 2015), ambos caracterizados por su papel en el desarrollo de la endometriosis. En otro estudio en ratas se observó que la aplicación de tretinoína reducía el volumen de los implantes endometriósicos sin afectar a la reserva ovárica, llegando a incrementar también la capacidad reproductiva (Ozer et al., 2013). Estos estudios indican la posibilidad de emplear este tratamiento para la endometriosis, regulando diversos mecanismos moleculares relacionados con la enfermedad, sin llegar a comprometer la capacidad reproductiva de las pacientes, efecto secundario asociado a alguno de los actuales tratamientos. Finalmente, la búsqueda en la literatura también confirmó la posible implicación de tres inhibidores de tirosín-quinasa predicha por el modelo basado en farmacología de sistemas para el tratamiento de la endometriosis. Tres estudios en humanos y en animales muestran el efecto del tratamiento de la endometriosis mediante la aplicación de **sorafenib**. Se trata de un compuesto antineoplásico indicado actualmente para el tratamiento de cáncer. En un estudio en el que se evaluaba la eficacia del mismo para el tratamiento de la endometriosis, este compuesto produjo una reducción tanto de los implantes endometriósicos en ratas sin afectación de la reserva ovárica (Ozer et al., 2013) como de la proliferación celular y de la angiogénesis, y una modulación de la inflamación en humanos (Leconte et al., 2015; Moggio et al., 2012). Finalmente, sólo un estudio evalúa el posible efecto de **regorafenib** y **fostamatinib** en el tratamiento de la endometriosis. Ambos fármacos se emplean actualmente para el cáncer. Sin

embargo, un estudio llevado a cabo por Wang y colaboradores (2022) predijo, mediante un estudio *in silico*, los efectos beneficiosos del fostamatinib para el tratamiento de la endometriosis, mediante un enfoque también basado en farmacología de sistemas. Los autores de este estudio integraron cuatro diferentes *datasets* de expresión génica de pacientes con endometriosis y mujeres sin endometriosis, y, tras realizar un análisis de expresión diferencial e integrar esa información con estudios de expresión génica de fármacos procedente del proyecto CMap, predijeron el beneficio de diferentes fármacos en el tratamiento de la enfermedad. Además, el fostamatinib se está estudiando actualmente en un ensayo clínico para el tratamiento de cáncer de ovario (NCT03246074), y es conocida la relación entre la endometriosis y el desarrollo de cáncer ovárico (Králíčková et al., 2020), por lo que podrían compartir mecanismos moleculares en común (Lu et al., 2015). Así pues, sería interesante evaluar el efecto de este fármaco en el tratamiento de ambas condiciones en conjunto. De hecho, y de acuerdo al modelo realizado, el fostamatinib tenía el mayor número de dianas moleculares asociadas con la endometriosis (90) entre todos los fármacos candidatos priorizados. Con respecto al regorafenib, sólo existe un estudio evaluando la eficacia en el tratamiento de la endometriosis. Se trata del reporte de un caso en el que se observó una regresión completa de la endometriosis en una paciente (Mir et al., 2019), por lo que serían necesarios más estudios que evalúen la efectividad de este tratamiento en una población de pacientes con la enfermedad. No obstante, el número y la gravedad de efectos secundarios descritos para estos compuestos apunta a que deberían estudiarse con cautela. En el caso del regorafenib se han descrito efectos secundarios como infarto de miocardio, hemorragias o incluso la muerte. Con respecto al fostamatinib, se encuentran algunos como daño fetal.

Seis de los compuestos candidatos priorizados (trióxido de arsénico, dasatinib, carvedilol, adenina, ácido cítrico y carfilzomib) no tenían ninguna referencia en la literatura que estudiara su efecto en el tratamiento de la endometriosis. No obstante, algunos de ellos han sido estudiados para el tratamiento de otras enfermedades reproductivas femeninas. En lo referente a la **adenina**, una purina empleada para el tratamiento de algunos desequilibrios dietéticos, tampoco se halló ninguna vinculación de su aplicación en endometriosis en la literatura científica. No obstante, cinco de las seis dianas moleculares de este compuesto están directamente relacionadas con el desarrollo y progresión de la endometriosis (*APRT*, *MTAP*, *ACACB*, *ACPI* y *SRPK2*) de acuerdo al análisis de la red de endometriosis. Por tanto, el hecho de que la mayoría de dianas moleculares sean biológicamente relevantes para el

desarrollo de la endometriosis, podría minimizar la aparición de efectos secundarios indeseados en otros tejidos. Además, una de las principales dianas moleculares de la adenina, AMPK (no contemplada en la base de datos de DrugBank), se encuentra en una ruta molecular desregulada en endometriosis (AMPK/mTOR). La hiperactivación de *mTORC1* y la hiporegulación de *AMPK* que se producen en endometriosis da como resultado una respuesta inflamatoria y autofagia aberrante, además de estimular la angiogénesis, la proliferación celular y la migración celular (Assaf et al., 2022). Además de en endometriosis, el gen *AMPK* también ha sido descrito por su importancia en la fertilidad femenina y la regeneración endometrial (McCallum et al., 2018; Yang et al., 2020), y su activación es requerida para una correcta receptividad uterina y una respuesta normal a hormonas esteroideas, que da lugar a una correcta decidualización (Griffiths et al., 2020). En otras enfermedades, como cáncer de colon, la adenina inhibe el crecimiento celular de células cancerosas mediante muerte celular y autofagia (Lai et al., 2019). Otros estudios también muestran el poder antiinflamatorio de este compuesto en células endoteliales de cordón umbilical, mediante la activación de AMPK (Cheng et al., 2015). Además, ciertos estudios avalan el efecto positivo de la activación de *AMPK* para el tratamiento de la endometriosis. Algunos trabajos muestran que otros compuestos, como la metformina, reducen significativamente la endometriosis vía activación de esta diana molecular (Kimber-Trojnar et al., 2022). Por tanto, su regulación podría explicar el mecanismo de acción por el cuál la adenina podría ser interesante tanto para el tratamiento de la endometriosis como para el tratamiento de la infertilidad. A pesar de que no se observó ningún efecto en la viabilidad celular en la línea inmortalizada de endometriosis, 12Z, los mecanismos descritos anteriormente podrían explicar su posible implicación tanto en el desarrollo y progresión de la enfermedad como en la infertilidad asociada. El **trióxido de arsénico**, compuesto con propiedades antineoplásicas, ha sido estudiado para el tratamiento de cáncer de endometrio (Bae-Jump et al., 2008; Zhou et al., 2007) y cáncer uterino (Hsin et al., 2019). Además, se ha observado que este compuesto tiene capacidad antiestrogénica, y la endometriosis es una enfermedad caracterizada por la sobreproducción de estrógenos, por lo que sería un compuesto potencial que podría ser probado en mujeres con endometriosis. **Dasatinib** ha sido estudiado también para el tratamiento de cáncer de endometrio con resultados prometedores. Este compuesto inhibe la proliferación celular en células de cáncer de útero y produce apoptosis en las mismas (Takiguchi et al., 2017) mediante la inhibición de SRC. En la red de endometriosis generada en el modelo de predicción, el gen *SRC* presenta altos valores de *degree centrality* (23) y *betweenness centrality* (0,02), lo que podría explicar el mecanismo

por el cuál este compuesto podría ser útil para el tratamiento de la endometriosis. No obstante, según el análisis de efectos secundarios, este compuesto es el que mayor número presenta (214) entre los priorizados por el modelo, incluyendo algunos como hemorragia, fallo cardíaco o incluso la muerte. El **carvedilol**, compuesto actualmente indicado para la hipertensión arterial, no muestra ninguna referencia en la literatura científica relacionada con el tratamiento de la endometriosis. No obstante, se sabe que este compuesto es un potente inhibidor de la proteína VCAM1. Este gen está sobreexpresado en mujeres con endometriosis (Kuessel et al., 2017; Schutt et al., 2015), y en la red de endometriosis presenta un alto valor de *degree centrality* (111) y *betweenness centrality* (0,15), por lo que podría ser un candidato para el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, debido a la cantidad y gravedad de efectos secundarios, fue descartado para futuros análisis de su efectividad *in vitro* contra la endometriosis. En lo referente al **ácido cítrico**, otro compuesto natural, tampoco fueron encontradas relaciones directas con el tratamiento de la endometriosis en la literatura. No obstante, existen estudios en modelos animales en los que se observan propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Grilli et al., 2015), por lo que algunos autores sugieren su posible beneficio en el tratamiento de la endometriosis (Schink et al., 2019). Este compuesto se encuentra de forma natural en frutas y verduras, por lo que un bajo consumo de éstas podría producir un incremento de posibilidades de desarrollar endometriosis. De hecho, en un estudio llevado a cabo por Harris y colaboradores (Harris et al., 2018) se validó esta hipótesis. Finalmente, para el **carfilzomib**, empleado para el tratamiento de cáncer, se hallaron estudios relacionados con su efectividad, tanto en cáncer endometrial (Zhou et al., 2016) como en cáncer de mama (Terzi et al., 2019). En esta última enfermedad se observó un efecto en la degradación del receptor de estrógenos (ESR1) y en la prevención de la señalización de estradiol y la proliferación celular (Busonero et al., 2018), lo que también podría ser interesante para el tratamiento de la endometriosis. A modo de curiosidad, cabe resaltar que, de los dieciséis compuestos candidatos priorizados, siete son antineoplásicos, lo que concuerda con el hecho de que existen mecanismos en común entre ambas enfermedades. En un meta-análisis realizado por Kvaskoff y colaboradores (Kvaskoff et al., 2021) se observó una asociación significativa entre la endometriosis y el mayor riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer, como el de ovario, mama o tiroides. Por otro lado, otros siete de los compuestos priorizados estaban relacionados con agentes naturales que pueden ser obtenidos mediante una correcta dieta alimentaria. En los últimos años se han llevado a cabo estudios analizando el impacto de la dieta en el desarrollo de la endometriosis, y se ha convertido en

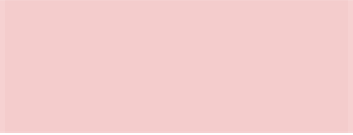
un tema de interés debido a que los procesos fisiológicos y patológicos de la enfermedad pueden verse influenciados por ella (Parazzini et al., 2013).

En los últimos años, el desarrollo de las tecnologías *ómicas* y de los métodos computacionales permite la integración de información de diferentes fuentes con el fin de desarrollar modelos de priorización basados en farmacología de sistemas como el del presente estudio. A pesar de ciertas limitaciones, como la falta de IPP para algunas proteínas humanas en el Interactoma, este tipo de metodologías permiten realizar hipótesis dirigidas al reposicionamiento racional de fármacos para enfermedades complejas como la endometriosis, ya que este tipo de enfoques sistemáticos permiten obtener una visión global de la enfermedad, en contraste con los métodos clásicos reduccionistas. Además, el Interactoma Humano empleado en la presente Tesis Doctoral ha sido validado mediante diferentes métodos experimentales, lo que permite obtener conclusiones más fiables que las de aquellos sistemas de priorización basados en IPP obtenidas por otros procedimientos. A pesar de que las conclusiones procedentes de esta clase de estudios deben ser validadas experimentalmente, este tipo de *screenings* proporcionan un valor añadido con respecto al desarrollo de nuevos medicamentos u otros enfoques basados en ensayos de prueba y error en los que no se tiene un conocimiento previo acerca de las relaciones moleculares entre los fármacos y enfermedades complejas como la endometriosis, permitiendo ahorrar tiempo y costes. Además, el reposicionamiento de fármacos agiliza el proceso debido al conocimiento *a priori* del perfil de seguridad de los medicamentos, ya que han sido previamente testados en ensayos clínicos en humanos para el tratamiento de otras enfermedades.

Conclusiones

“La vida es el arte de sacar conclusiones suficientes a partir de datos insuficientes.”

- *Samuel Butler*



1. El modelo molecular de interacción de proteínas que representa la complejidad de la endometriosis cumple con los criterios adecuados para priorizar compuestos para endometriosis, pues es *scale-free* (o libre de escala), propiedad que representa una red biológica real, presentando además una alta conectividad.
2. Se han identificado 2.317 genes relacionados con el desarrollo y progresión de la endometriosis y 416 genes relacionados con efecto en el endometrio. Estos conjuntos de genes muestran un alto grado de aglomeración en la red de endometriosis mediante interacciones físicas, lo que resalta su relación funcional dentro del modelo molecular confeccionado.
3. A partir de la red de endometriosis fueron priorizados dieciséis compuestos candidatos empleados en otras enfermedades y que son susceptibles de ser reposicionados para el tratamiento de la endometriosis y/o la infertilidad asociada, pues presentan una alta relación a nivel molecular con los genes de enfermedad. Dichos compuestos, en conjunto, son más efectivos a nivel molecular contra la endometriosis que los actuales tratamientos, tal y como muestra el análisis de distancias en el Interactoma Humano entre sus dianas moleculares y los genes de enfermedad. Además, para diez de ellos se encontraron en la literatura científica estudios validando su efectividad en el tratamiento de la endometriosis o la infertilidad.
4. Tres de los compuestos candidatos con menos efectos secundarios, zinc, cobre y resveratrol, muestran efectividad en el tratamiento de la endometriosis *in vitro*, ya que inhiben la proliferación de las células de endometriosis. A pesar de que más estudios son necesarios, el análisis de interacciones fármaco-fármaco revela que podrían emplearse en combinación, ofreciendo una alternativa polifarmacológica para el tratamiento de la enfermedad.
5. Dos de los compuestos candidatos, NADH y glutatión, muestran efectos adversos en el tratamiento de la endometriosis, pues promueven la proliferación celular *in vitro* de las células de endometriosis.
6. El presente modelo basado en farmacología de sistemas ha permitido priorizar compuestos que responden a la enfermedad en cultivos celulares y no presentan efectos secundarios, hecho que refuerza la conveniencia de su incorporación a futuros ensayos clínicos en pacientes con endometriosis y la posibilidad de la personalización de tratamientos con diferentes modos de acción en función de las características fisiopatológicas de cada paciente.

Material Suplementario

“Un sutil pensamiento erróneo puede dar lugar a una indagación fructífera que revela verdades de gran valor.”

- *Isaac Asimov*



Figura Suplementaria 1. Resumen esquemático de la metodología empleada para realizar el modelo de priorización basado en farmacología de sistemas para el reposicionamiento de fármacos en endometriosis.

Se detallan los datos integrados para realizar el modelo de priorización de fármacos/compuestos para su reposicionamiento en endometriosis. El color de las líneas indica el tipo de información incluida y algunas de las bases de datos empleadas para alcanzar cada uno de los objetivos. *Creado con BioRender.com*

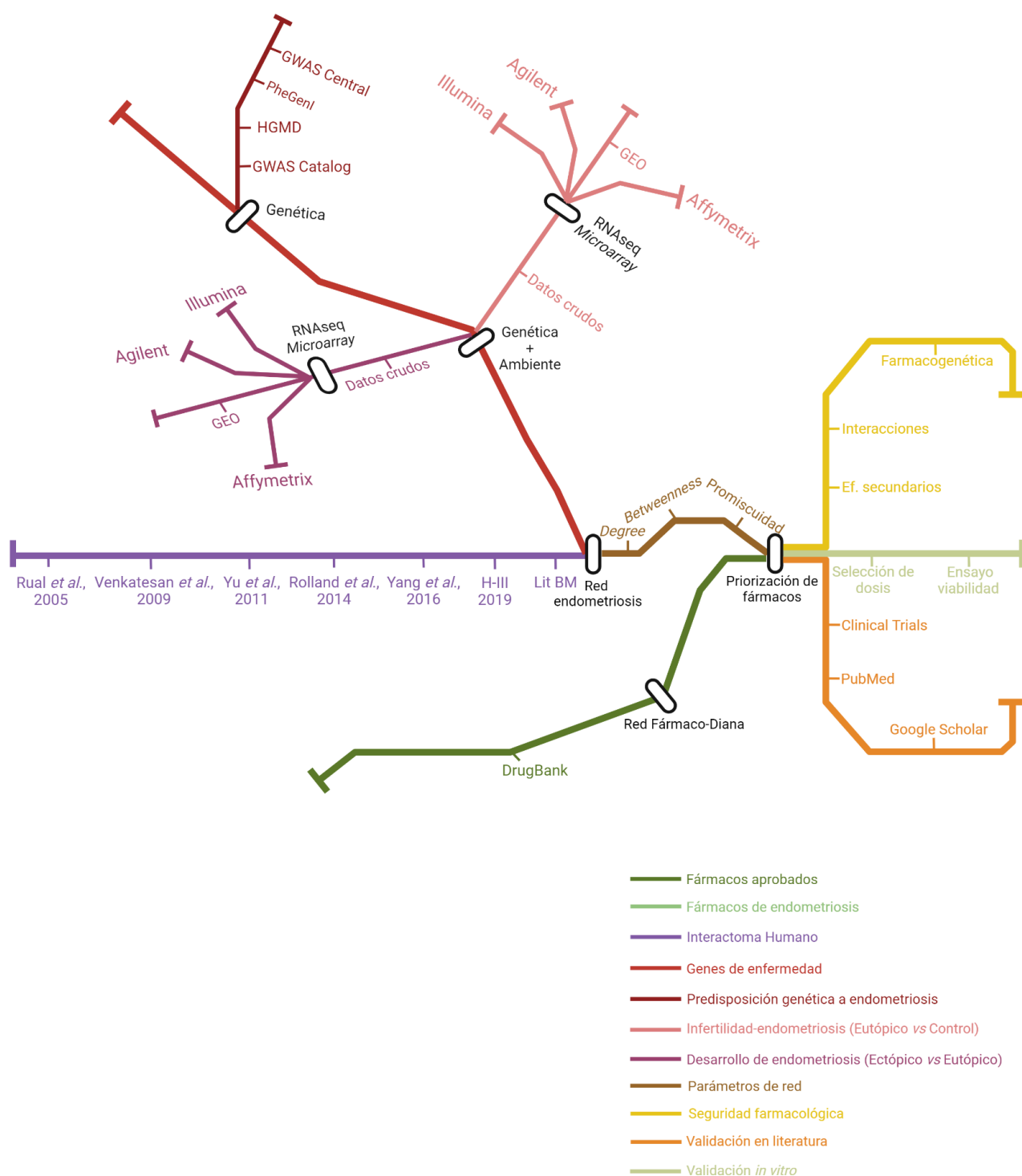


Tabla Suplementaria 1. Clasificación de los estudios hallados inicialmente para seleccionar los genes asociados a la endometriosis, tanto aquellos con efecto en el tejido ex situ (A), como en el propio endometrio (B). Se representa el identificador de cada estudio, el año en el que fue realizado, el número de muestras de tejido ectópico, el número de muestras de tejido eútopico, el número de muestras de tejido control (endometrio normal), el estadio de la endometriosis (I-IV), la fase del ciclo menstrual y la plataforma de *microarray* o RNAseq empleada.

A) Estudios de Ectópico vs Eutópico

Estudio	Año	Ectópico	Eutópico	Estado	Fase ciclo	Plataforma
GSE105764	2018	8	8	III-IV	SEC	Illumina HiSeq 4000
GSE11691	2008	8	9	II-IV	PRO, SEC	HG-U133-A
GSE25628	2013	8	7	II-IV	PRO	HG-U133-A2
GSE7305	2007	10	10	n/d	FOL, LUT	HG-U133-Plus2
GSE37837	2011	18	18	III-IV	PRO, SEC	Agilent-014850

B) Estudios de Eutópico vs Control

Estudio	Año	Eutópico	Control	Estado	Fase ciclo	Plataforma
GSE120103	2019	16	18	IV	n/d	Agilent 4x44K
GSE25628	2013	8	6	II-IV	PRO	HG-U133-A2
GSE6364	2007	21	16	IV	PRO, ESE, MSE	HG-U133-Plus2

SEC, secretora; PRO, proliferativa; FOL, folicular; LUT, lútea; ESE, early secretory (secretora temprana); MSE, mild secretory (secretora media); n/d, no disponible

Tabla Suplementaria 2. Estudios de la relación de los fármacos/compuestos priorizados en esta Tesis con la endometriosis y/o infertilidad femenina. Se muestra el nombre del fármaco/compuesto candidato, la dosis empleada, la especie en la que se realiza el estudio, el tipo de estudio (*in silico*, *in vivo* o *in vitro*) y el resumen de la relación del fármaco/compuesto candidato con la endometriosis y/o la infertilidad femenina.

Fármaco/Compuesto	Dosis	Especie	Tipo estudio	Resumen
Resveratrol	10-25 mg/kg	Ratón	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	Potente efecto inhibitorio del desarrollo de la endometriosis en un modelo murino (BALB/c) (Ricci et al., 2013)
	40-120 μ M	Humano	<i>In vivo</i>	Inducción de apoptosis en células endometrióticas (Taguchi et al., 2016)
	30 mg/kg	Humano	<i>In vivo</i>	Efecto antiinflamatorio y antiangiogénico en células endometrióticas (Bayoglu Tekin et al., 2015)
	400 mg/kg	Humano	<i>In vivo</i>	Disminución de la expresión de genes relacionados con la inflamación (Kodarahmian et al., 2019)
	60 mg/kg/día	Rata	<i>In vivo</i>	Reducción de lesiones endometrióticas y la expresión de <i>VEGF</i> y <i>MCPI</i> (Ozcan Cenksoy et al., 2015)
	40 mg/kg/día	Ratón	<i>In vivo</i>	Reducción de la vascularización en lesiones endometriales y reducción del tamaño de las lesiones (Rudzitis-Auth et al., 2013)
	40 mg/kg/día	Rata	<i>In vivo</i>	Supresión de la angiogénesis en tejido endometriótico (Bahrami et al., 2021)
	0-200 μ M	Humano	<i>In vitro</i>	Disminución del crecimiento de tejido endometriótico y aumento de apoptosis (Khazaei et al., 2020)
	400 mg	Humano	<i>In vivo</i>	Modulación de la expresión de genes relacionados con angiogénesis (Khodarahmian et al., 2021)

10-100 mg/kg	Rata	<i>In vivo</i>	Reducción del tamaño de lesiones endometrióticas y regulación de genes relacionados con estrés oxidativo (Yavuz et al., 2014)
30 mg	Humano	<i>In vivo</i>	Reducción del dolor en mujeres con endometriosis en combinación con anticonceptivos (Maia et al., 2012)
10 mg/kg/día	Rata	<i>In vivo</i>	Reducción del tamaño de implantes endometriósicos y regulación de genes relacionados con angiogénesis e inflamación (Ergenoğlu et al., 2013)
15-45 mg/kg/día	Rata	<i>In vivo</i>	Regulación de genes relacionados con inflamación, inmunoregulación y metabolismo de lípidos (C. Wang et al., 2021)
10-30 µM	Rata	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Reducción del tamaño de implantes endometriósicos y la invasión celular (Bruner-Tran et al., 2011)
10-40 µM	Humano	<i>In vitro</i>	Efecto antiinflamatorio y regulación de genes relacionados con inflamación (Taguchi et al., 2014)
100 µM	Humano	<i>In vitro</i>	Regulación de marcadores moleculares de endometriosis (Arablou et al., 2021)
100 µmol/L	Humano	<i>In vitro</i>	Regulación de genes relacionados con inflamación (Kolahdouz-Mohammadi et al., 2021)
100 µM	Humano	<i>In vitro</i>	Regulación de genes relacionados con la endometriosis en células ectópicas y eutópicas (Arablou et al., 2019)
25 mg/kg	Humano Rata	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Inhibición del crecimiento de lesiones endometrióticas y regulación de genes relacionados proliferación celular, migración e invasión (Kong et al., 2020)
15-45	Humano	<i>In vitro</i>	Reducción de proliferación e invasión y

	mg/kg/día	Rata	<i>In vivo</i>	aumento de apoptosis en lesiones endometrióticas (Z. Chen et al., 2021)
Zinc	n/d	Humano	<i>In vivo</i>	Los niveles de zinc en sangre son menores en mujeres con infertilidad que en controles (Lu et al., 2020)
	n/d	Humano	<i>In vivo</i>	Los niveles de zinc en líquido folicular son mayores en pacientes con endometriosis que quedaron embarazadas que en aquellas que no quedaron embarazadas (Singh et al., 2013)
	1-30 mg/kg	Ratón	<i>In vivo</i>	La calidad ovulatoria y embrionaria es mayor en sujetos tratados con dieta rica en zinc (Tian & Diaz, 2012)
	n/d	Humano	<i>In vivo</i>	Los niveles de zinc en suero son menores en mujeres con endometriosis que en controles (Messalli et al., 2014)
	n/d	Humano	<i>In vivo</i>	Los niveles de zinc en sangre son menores en mujeres infértiles con endometriosis que en infértiles sin endometriosis (Lai et al., 2017)
	n/d	Humano	<i>In vivo</i>	Las mujeres con endometriosis tienen una dieta más baja en zinc que las controles (Mier-Cabrera et al., 2009)
	n/d	Humano	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Los niveles de zinc en suero de mujeres con quistes endometriales eran menores que en mujeres con quistes benignos no endometriales (Onuma et al., 2023)
NADH	n/d	Humano Primate	<i>In vivo</i>	Los niveles de NADH son menores en mujeres/primates con endometriosis que en las controles (Atkins et al., 2019)
Aspirina	0,2 g/mL	Conejo	<i>In vivo</i>	Destrucción total de la endometriosis peritoneal (Saad-Hossne et al., 2016)
	2 mg/kg/día	Rata	<i>In vivo</i>	Posible regulación de la resistencia a progesterona durante la ventana de

implantación, lo que podría mejorar la tasa de implantación y de embarazo en mujeres con endometriosis (L. Wang et al., 2021)

	50 mg/mL	Conejo	<i>In vivo</i>	Reducción de los implantes endometriósicos (Siqueira et al., 2011)
	0-2,5 mmol/l	Humano	<i>In vitro</i>	Supresión de la invasión celular en células eutópicas estromales derivadas de mujeres con endometriosis e infertilidad (Nasiri et al., 2021)
	n/d	Humano	<i>In vivo</i>	Mejora de los síntomas del dolor asociado a la endometriosis y la dismenorrea (Moini et al., 2021)
	80 mg/día	Humano	<i>In vivo</i>	Mejora de las tasas de embarazo e implantación embrionaria en mujeres infértiles con endometriosis (Kim et al., 2002)
Tretinoína	10 ⁻⁷ M	Humano	<i>In vitro</i>	Regulación de genes relacionados con proliferación celular y metabolismo de estrógenos en células estromales de endometriosis (Yamagata et al., 2015)
	n/d	Rata	<i>In vivo</i>	Reducción del volumen de los implantes endometriósicos sin afectación de la reserva ovárica. Además, incrementó la capacidad reproductiva (Ozer et al., 2013)
Regorafenib	160 mg/día	Humano	<i>In vivo</i>	Regresión completa de la endometriosis en una mujer (Mir et al., 2019)
Sorafenib	n/d	Rata	<i>In vivo</i>	Reducción del volumen de los implantes endometrióticos sin afectación de la reserva ovárica (Ozer et al., 2013)
	1-10 mM	Humano	<i>In vitro</i>	Reducción de la proliferación, motilidad y angiogénesis en células madre mesenquimáticas de tejido endometriósico (Moggio et al., 2012)
	50 mg/kg/día	Humano	<i>In vitro</i>	Efecto anti-angiogénico y regulación de la

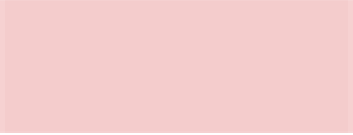
		Ratón	<i>In vivo</i>	proliferación e inflamación (Leconte et al., 2015)
Fostamatinib	n/d	Humano	<i>In silico</i>	Predicción de efectos terapéuticos en endometriosis (Wang et al., 2022)
Glutación	n/d	Humano	<i>In vitro</i>	Niveles reducidos de glutación en células ectópicas endometriales de mujeres con endometriosis en comparación con las células de endometrio eutópico (Jamali et al., 2019)
	0-6 mmol/L	Humano	<i>In vitro</i>	El tratamiento con glutación redujo la concentración de H ₂ O ₂ (relacionado con estrés oxidativo) y la proliferación en células entrometriósicas (Ngô et al., 2009)
	1,8 g/día	Humano	<i>In vivo</i>	Reducción del tamaño de endometriomas tras el tratamiento con N-acetilcisteína (precursor directo del glutación) sin interferencia en la ovulación (Porpora, Brunelli, et al., 2013)
Cobre	n/d	Humano	<i>In vivo</i>	Los niveles de cobre son menores en pacientes con infertilidad que en controles (Soltan & Jenkins, 1983)
	n/d	Humano	<i>In vivo</i>	Los niveles de cobre son menores en pacientes con aborto o infertilidad que en las embarazadas (Skalnaya et al., 2019)
	n/d	Humano	<i>In vivo</i>	La liberación de cobre durante dos ciclos menstruales mediante DIU antes de la implantación embrionaria, mejoró las tasas de implantación, embarazo bioquímico y embarazo clínico en mujeres con fallo de implantación recurrente (Mao et al., 2017)

DIU, dispositivo intrauterino; n/d, no disponible

Bibliografía

“Lo que más amo de la ciencia es que, a medida que aprendes, realmente no obtienes respuestas; sólo tienes mejores preguntas.”

- *John Green*



- Alimi, Y., Iwanaga, J., Loukas, M., & Tubbs, R. S. (2018). The Clinical Anatomy of Endometriosis: A Review. *Cureus*, 10(9), e3361. <https://doi.org/10.7759/cureus.3361>
- Almassinokiani, F., Mehdizadeh, A., Sariri, E., Rezaei, M., Almasi, A., Akbari, H., Pazooki, A., Solaymani-Dodaran, M., Asadollah, S., Amirkhani, J., Chaichian, S., Vahdat, M., Moosavi, A., Ashouri, M., & Tamannaee, Z. (2013). Effects of simvastatin in prevention of pain recurrences after surgery for endometriosis. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 19, 534-539. <https://doi.org/10.12659/MSM.883967>
- Amala, A., & Emerson, I. A. (2019). Identification of target genes in cancer diseases using protein–protein interaction networks. *Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics*, 8(1), 2. <https://doi.org/10.1007/s13721-018-0181-1>
- Angione, C. (2019). Human Systems Biology and Metabolic Modelling: A Review—From Disease Metabolism to Precision Medicine. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8304260>
- Arablou, T., Aryaeian, N., Khodaverdi, S., Kolahdouz-Mohammadi, R., Moradi, Z., Rashidi, N., & Delbandi, A.-A. (2021). The effects of resveratrol on the expression of VEGF, TGF- β , and MMP-9 in endometrial stromal cells of women with endometriosis. *Scientific Reports*, 11(1), 6054. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85512-y>
- Arablou, T., Delbandi, A.-A., Khodaverdi, S., Arefi, S., Kolahdouz-Mohammadi, R., Heidari, S., Mohammadi, T., & Aryaeian, N. (2019). Resveratrol reduces the expression of insulin-like growth factor-1 and hepatocyte growth factor in stromal cells of women with endometriosis compared with nonendometriotic women. *Phytotherapy Research: PTR*, 33(4), 1044-1054. <https://doi.org/10.1002/ptr.6298>
- Armstrong, G. M., Maybin, J. A., Murray, A. A., Nicol, M., Walker, C., Saunders, P. T. K., Rossi, A. G., & Critchley, H. O. D. (2017). Endometrial apoptosis and neutrophil infiltration during menstruation exhibits spatial and temporal dynamics that are recapitulated in a mouse model. *Scientific Reports*, 7(1), 17416. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17565-x>
- Assaf, L., Eid, A. A., & Nassif, J. (2022). Role of AMPK/mTOR, mitochondria, and ROS in the pathogenesis of endometriosis. *Life Sciences*, 306, 120805. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120805>
- Assenov, Y., Ramírez, F., Schelhorn, S.-E., Lengauer, T., & Albrecht, M. (2008). Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics*, 24(2), 282-284. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm554>
- Atkins, H. M., Bharadwaj, M. S., O'Brien Cox, A., Furdui, C. M., Appt, S. E., & Caudell, D. L. (2019). Endometrium and endometriosis tissue mitochondrial energy metabolism in a nonhuman primate model. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 17(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0513-8>
- Attar, E., & Bulun, S. E. (2006). Aromatase inhibitors: The next generation of therapeutics for endometriosis? *Fertility and Sterility*, 85(5), 1307-1318. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.09.064>
- Azad, A. K. M., Dinarvand, M., Nematollahi, A., Swift, J., Lutze-Mann, L., & Vafaei, F. (2021). A comprehensive integrated drug similarity resource for in-silico drug repositioning and beyond. *Briefings in Bioinformatics*, 22(3). <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa126>
- Bae-Jump, V. L., Zhou, C., Boggess, J. F., & Gehrig, P. A. (2008). Arsenic Trioxide (As₂O₃) Inhibits Expression of Estrogen Receptor—Alpha Through Regulation of the Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Pathway in Endometrial Cancer Cells.

- Reproductive Sciences*, 15(10), 1011-1017.
<https://doi.org/10.1177/1933719108324134>
- Bahrami, A., Ayen, E., Razi, M., & Behfar, M. (2021). Effects of atorvastatin and resveratrol against the experimental endometriosis; evidence for glucose and monocarboxylate transporters, neoangiogenesis. *Life Sciences*, 272, 119230.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119230>
- Banu, S. K., Lee, J., Starzinski-Powitz, A., & Arosh, J. A. (2008). Gene expression profiles and functional characterization of human immortalized endometriotic epithelial and stromal cells. *Fertility and Sterility*, 90(4), 972-987.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.07.1358>
- Barabási, A.-L., Gulbahce, N., & Loscalzo, J. (2011). Network medicine: A network-based approach to human disease. *Nature Reviews. Genetics*, 12(1), 56-68.
<https://doi.org/10.1038/nrg2918>
- Barrett, T., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I. F., Tomashevsky, M., Marshall, K. A., Phillippy, K. H., Sherman, P. M., Holko, M., Yefanov, A., Lee, H., Zhang, N., Robertson, C. L., Serova, N., Davis, S., & Soboleva, A. (2013). NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D991-D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1193>
- Bartel, P. L., Roecklein, J. A., SenGupta, D., & Fields, S. (1996). A protein linkage map of Escherichia coli bacteriophage T7. *Nature Genetics*, 12(1), 72-77.
<https://doi.org/10.1038/ng0196-72>
- Bayoglu Tekin, Y., Guven, S., Kirbas, A., Kalkan, Y., Tumkaya, L., & Guvendag Guven, E. S. (2015). Is resveratrol a potential substitute for leuprolide acetate in experimental endometriosis? *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 184, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.10.041>
- Beck, T., Hastings, R. K., Gollapudi, S., Free, R. C., & Brookes, A. J. (2014). GWAS Central: A comprehensive resource for the comparison and interrogation of genome-wide association studies. *European Journal of Human Genetics*, 22(7), Article 7.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.274>
- Becker, C. M., Bokor, A., Heikinheimo, O., Horne, A., Jansen, F., Kiesel, L., King, K., Kvaskoff, M., Nap, A., Petersen, K., Saridogan, E., Tomassetti, C., Van Hanegem, N., Vulliemoz, N., Vermeulen, N., ESHRE Endometriosis Guideline Group, Altmäe, S., Ata, B., Ball, E., ... Yazbeck, C. (2022). ESHRE guideline: Endometriosis. *Human Reproduction Open*, 2022(2), hoac009. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoac009>
- Becker, C. M., Gattrell, W. T., Gude, K., & Singh, S. S. (2017). Reevaluating response and failure of medical treatment of endometriosis: A systematic review. *Fertility and Sterility*, 108(1), 125-136. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.004>
- Becker, C. M., Sampson, D. A., Short, S. M., Javaherian, K., Folkman, J., & D'Amato, R. J. (2006). Short synthetic endostatin peptides inhibit endothelial migration in vitro and endometriosis in a mouse model. *Fertility and Sterility*, 85(1), 71-77.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.07.1290>
- Bedaiwy, M. A., Alfaraj, S., Yong, P., & Casper, R. (2017). New developments in the medical treatment of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 107(3), 555-565.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.12.025>
- Bedaiwy, M. A., Falcone, T., Sharma, R. K., Goldberg, J. M., Attaran, M., Nelson, D. R., & Agarwal, A. (2002). Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: A prospective controlled trial. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 17(2), 426-431. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.2.426>

- Bedaiwy, M. A., Mousa, N. A., & Casper, R. F. (2009). Aromatase inhibitors prevent the estrogen rise associated with the flare effect of gonadotropins in patients treated with GnRH agonists. *Fertility and Sterility*, 91(4 Suppl), 1574-1577. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.09.077>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Berkley, K. J., Rapkin, A. J., & Papka, R. E. (2005). The pains of endometriosis. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1587-1589. <https://doi.org/10.1126/science.1111445>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235-242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bhat, M. A., Sharma, J. B., Roy, K. K., Sengupta, J., & Ghosh, D. (2019). Genomic evidence of Y chromosome microchimerism in the endometrium during endometriosis and in cases of infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 17(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0465-z>
- Bilotas, M., Meresman, G., Stella, I., Sueldo, C., & Barañao, R. I. (2010). Effect of aromatase inhibitors on ectopic endometrial growth and peritoneal environment in a mouse model of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 93(8), 2513-2518. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.08.058>
- Boretto, M., Maenhoudt, N., Luo, X., Hennes, A., Boeckx, B., Bui, B., Heremans, R., Perneel, L., Kobayashi, H., Van Zundert, I., Brems, H., Cox, B., Ferrante, M., Uji-i, H., Koh, K. P., D'Hooghe, T., Vanhie, A., Vergote, I., Meuleman, C., ... Vankelecom, H. (2019). Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening. *Nature Cell Biology*, 21(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0360-z>
- Borneman, A. R., Leigh-Bell, J. A., Yu, H., Bertone, P., Gerstein, M., & Snyder, M. (2006). Target hub proteins serve as master regulators of development in yeast. *Genes & Development*, 20(4), 435-448. <https://doi.org/10.1101/gad.1389306>
- Braun, P., Tasan, M., Dreze, M., Barrios-Rodiles, M., Lemmens, I., Yu, H., Sahalie, J. M., Murray, R. R., Roncari, L., De Smet, A.-S., Venkatesan, K., Rual, J.-F., Vandenhaute, J., Cusick, M. E., Pawson, T., Hill, D. E., Tavernier, J., Wrana, J. L., Roth, F. P., & Vidal, M. (2009). An experimentally derived confidence score for binary protein-protein interactions. *Nature Methods*, 6(1), 91-97. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1281>
- Brawn, J., Morotti, M., Zondervan, K. T., Becker, C. M., & Vincent, K. (2014). Central changes associated with chronic pelvic pain and endometriosis. *Human Reproduction Update*, 20(5), 737-747. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu025>
- Brouwers, L., Iskar, M., Zeller, G., Noort, V. van, & Bork, P. (2011). Network Neighbors of Drug Targets Contribute to Drug Side-Effect Similarity. *PLOS ONE*, 6(7), e22187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022187>
- Bruner-Tran, K. L., Osteen, K. G., & Duleba, A. J. (2009). Simvastatin protects against the development of endometriosis in a nude mouse model. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(7), 2489-2494. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2802>
- Bruner-Tran, K. L., Osteen, K. G., Taylor, H. S., Sokalska, A., Haines, K., & Duleba, A. J. (2011). Resveratrol inhibits development of experimental endometriosis in vivo and

- reduces endometrial stromal cell invasiveness in vitro. *Biology of Reproduction*, 84(1), 106-112. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086744>
- Buck Louis, G. M., Peterson, C. M., Chen, Z., Croughan, M., Sundaram, R., Stanford, J., Varner, M. W., Kennedy, A., Giudice, L., Fujimoto, V. Y., Sun, L., Wang, L., Guo, Y., & Kannan, K. (2013). Bisphenol A and phthalates and endometriosis: The Endometriosis: Natural History, Diagnosis and Outcomes Study. *Fertility and Sterility*, 100(1), 162-169.e1-2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.026>
- Bulletti, C., Coccia, M. E., Battistoni, S., & Borini, A. (2010). Endometriosis and infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(8), 441-447. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9436-1>
- Buniello, A., MacArthur, J. A. L., Cerezo, M., Harris, L. W., Hayhurst, J., Malangone, C., McMahon, A., Morales, J., Mountjoy, E., Sollis, E., Suveges, D., Vrousseau, O., Whetzel, P. L., Amode, R., Guillen, J. A., Riat, H. S., Trevanion, S. J., Hall, P., Junkins, H., ... Parkinson, H. (2019). The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D1005-D1012. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1120>
- Burney, R. O., & Giudice, L. C. (2012). Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 98(3), 511-519. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.029>
- Burney, R. O., Talbi, S., Hamilton, A. E., Vo, K. C., Nyegaard, M., Nezhat, C. R., Lessey, B. A., & Giudice, L. C. (2007). Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology*, 148(8), 3814-3826. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1692>
- Busonero, C., Leone, S., Klemm, C., & Acconcia, F. (2018). A functional drug re-purposing screening identifies carfilzomib as a drug preventing 17 β -estradiol: ER α signaling and cell proliferation in breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 460, 229-237. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.027>
- Campillos, M., Kuhn, M., Gavin, A.-C., Jensen, L. J., & Bork, P. (2008). Drug Target Identification Using Side-Effect Similarity. *Science*, 321(5886), 263-266. <https://doi.org/10.1126/science.1158140>
- Cassonnet, P., Rolloy, C., Neveu, G., Vidalain, P.-O., Chantier, T., Pellet, J., Jones, L., Muller, M., Demeret, C., Gaud, G., Vuillier, F., Lotteau, V., Tangy, F., Favre, M., & Jacob, Y. (2011). Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein complexes. *Nature Methods*, 8(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1773>
- Chen, M., Zhou, Y., Xu, H., Hill, C., Ewing, R. M., He, D., Zhang, X., & Wang, Y. (2020). Bioinformatic analysis reveals the importance of epithelial-mesenchymal transition in the development of endometriosis. *Scientific Reports*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65606-9>
- Chen, Y., Wei, J., Zhang, Y., Sun, W., Li, Z., Wang, Q., Xu, X., Li, C., & Li, P. (2018). Anti-endometriosis Mechanism of Jiawei Foshou San Based on Network Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00811>
- Chen, Z., Wang, C., Lin, C., Zhang, L., Zheng, H., Zhou, Y., Li, X., Li, C., Zhang, X., Yang, X., Guan, M., & Xi, Y. (2021). Lipidomic Alterations and PPAR α Activation Induced by Resveratrol Lead to Reduction in Lesion Size in Endometriosis Models. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 9979953. <https://doi.org/10.1155/2021/9979953>
- Cheng, F., Desai, R. J., Handy, D. E., Wang, R., Schneeweiss, S., Barabási, A.-L., &

- Loscalzo, J. (2018). Network-based approach to prediction and population-based validation of in silico drug repurposing. *Nature Communications*, 9(1), 2691. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05116-5>
- Cheng, Y.-F., Young, G.-H., Lin, J.-T., Jang, H.-H., Chen, C.-C., Nong, J.-Y., Chen, P.-K., Kuo, C.-Y., Kao, S.-H., Liang, Y.-J., & Chen, H.-M. (2015). Activation of AMP-Activated Protein Kinase by Adenine Alleviates TNF-Alpha-Induced Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *PLoS ONE*, 10(11), e0142283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142283>
- Chwalisz, K., Perez, M. C., Demanno, D., Winkel, C., Schubert, G., & Elger, W. (2005). Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endocrine Reviews*, 26(3), 423-438. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0001>
- Clemenza, S., Sorbi, F., Noci, I., Capezzuoli, T., Turrini, I., Carriero, C., Buffi, N., Fambrini, M., & Petraglia, F. (2018). From pathogenesis to clinical practice: Emerging medical treatments for endometriosis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 51, 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.01.021>
- Clough, E., & Barrett, T. (2016). The Gene Expression Omnibus Database. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1418, 93-110. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9_5
- Collins, J. A., Burrows, E. A., & Willan, A. R. (1995). The prognosis for live birth among untreated infertile couples*. *Fertility and Sterility*, 64(1), 22-28. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)57650-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)57650-X)
- Cotto, K. C., Wagner, A. H., Feng, Y.-Y., Kiwala, S., Coffman, A. C., Spies, G., Wollam, A., Spies, N. C., Griffith, O. L., & Griffith, M. (2018). DGIdb 3.0: A redesign and expansion of the drug-gene interaction database. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D1068-D1073. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1143>
- Crispi, S., Piccolo, M. T., D'Avino, A., Donizetti, A., Viceconte, R., Spyrou, M., Calogero, R. A., Baldi, A., & Signorile, P. G. (2013). Transcriptional profiling of endometriosis tissues identifies genes related to organogenesis defects. *Journal of Cellular Physiology*, 228(9), 1927-1934. <https://doi.org/10.1002/jcp.24358>
- Croft, D., O'Kelly, G., Wu, G., Haw, R., Gillespie, M., Matthews, L., Caudy, M., Garapati, P., Gopinath, G., Jassal, B., Jupe, S., Kalatskaya, I., Mahajan, S., May, B., Ndegwa, N., Schmidt, E., Shamovsky, V., Yung, C., Birney, E., ... Stein, L. (2011). Reactome: A database of reactions, pathways and biological processes. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_1), D691-D697. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1018>
- Csermely, P., Korcsmáros, T., Kiss, H. J. M., London, G., & Nussinov, R. (2013). Structure and dynamics of molecular networks: A novel paradigm of drug discovery: a comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(3), 333-408. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.016>
- Cucurull-Sanchez, L., Chappell, M. J., Chelliah, V., Amy Cheung, S. Y., Derks, G., Penney, M., Phipps, A., Malik-Sheriff, R. S., Timmis, J., Tindall, M. J., Van Der Graaf, P. H., Vicini, P., & Yates, J. W. T. (2019). Best Practices to Maximize the Use and Reuse of Quantitative and Systems Pharmacology Models: Recommendations From the United Kingdom Quantitative and Systems Pharmacology Network. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 8(5), 259-272. <https://doi.org/10.1002/psp4.12381>
- Dabrosin, C., Gyorffy, S., Margetts, P., Ross, C., & Gauldie, J. (2002). Therapeutic effect of angiostatin gene transfer in a murine model of endometriosis. *The American Journal*

- of *Pathology*, 161(3), 909-918. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64251-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64251-4)
- Davis, A. P., Grondin, C. J., Johnson, R. J., Sciaky, D., McMorran, R., Wiegers, J., Wiegers, T. C., & Mattingly, C. J. (2019). The Comparative Toxicogenomics Database: Update 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D948-D954. <https://doi.org/10.1093/nar/gky868>
- de la Fuente, A. (2010). From «differential expression» to 'differential networking'—Identification of dysfunctional regulatory networks in diseases. *Trends in Genetics: TIG*, 26(7), 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.05.001>
- De Pascali, F., Casarini, L., Kuhn, C., Simoni, M., Mahner, S., Jeschke, U., & Von Schönfeldt, V. (2021). Nuclear expression of VDR and AHR is mutually exclusive in glandular cells in endometriosis. *Histochemistry and Cell Biology*, 156(4), 391-399. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02005-9>
- del Sol, A., Balling, R., Hood, L., & Galas, D. (2010). Diseases as network perturbations. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(4), 566-571. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.07.010>
- Devesa-Peiro, A., Sebastian-Leon, P., Pellicer, A., & Diaz-Gimeno, P. (2021). Guidelines for biomarker discovery in endometrium: Correcting for menstrual cycle bias reveals new genes associated with uterine disorders. *Molecular Human Reproduction*, 27(4). <https://doi.org/10.1093/molehr/gaab011>
- D'Hooghe, T. M., Kyama, C. M., Chai, D., Fassbender, A., Vodolazkaia, A., Bokor, A., & Mwenda, J. M. (2009). Nonhuman primate models for translational research in endometriosis. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 16(2), 152-161. <https://doi.org/10.1177/1933719108322430>
- Dunselman, G. a. J., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D'Hooghe, T., De Bie, B., Heikinheimo, O., Horne, A. W., Kiesel, L., Nap, A., Prentice, A., Saridogan, E., Soriano, D., Nelen, W., & European Society of Human Reproduction and Embryology. (2014). ESHRE guideline: Management of women with endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 29(3), 400-412. <https://doi.org/10.1093/humrep/det457>
- Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E., & Huber, W. (2009). Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nature Protocols*, 4(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.97>
- El, F., Af, de O. J., S, T., Sb, J., Rs, F., D, B., P, G., A, S., & V, A. (2015). In Silico Protein-Protein Interactions: Avoiding Data and Method Biases Over Sensitivity and Specificity. *Current Protein & Peptide Science*, 16(8). <https://doi.org/10.2174/1389203716666150505235437>
- Emera, D., Romero, R., & Wagner, G. (2012). The evolution of menstruation: A new model for genetic assimilation: explaining molecular origins of maternal responses to fetal invasiveness. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 34(1), 26-35. <https://doi.org/10.1002/bies.201100099>
- Emmons, S., Kobourov, S., Gallant, M., & Börner, K. (2016). Analysis of Network Clustering Algorithms and Cluster Quality Metrics at Scale. *PLOS ONE*, 11(7), e0159161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159161>
- Ergenoğlu, A. M., Yeniel, A. Ö., Erbaş, O., Aktuğ, H., Yildirim, N., Ulukuş, M., & Taskiran, D. (2013). Regression of endometrial implants by resveratrol in an experimentally induced endometriosis model in rats. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 20(10), 1230-1236. <https://doi.org/10.1177/1933719113483014>
- Esfandiari, N., Khazaei, M., Ai, J., Bielecki, R., Gotlieb, L., Ryan, E., & Casper, R. F. (2007).

- Effect of a statin on an in vitro model of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 87(2), 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.06.040>
- Eyckerman, S., Verhee, A., der Heyden, J. V., Lemmens, I., Ostade, X. V., Vandekerckhove, J., & Tavernier, J. (2001). Design and application of a cytokine-receptor-based interaction trap. *Nature Cell Biology*, 3(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/ncb1201-1114>
- Fan, H. (2020). In-vitro models of human endometriosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(3), 1617. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8363>
- Fang, H., Su, Z., Wang, Y., Miller, A., Liu, Z., Howard, P. C., Tong, W., & Lin, S. M. (2014). Exploring the FDA Adverse Event Reporting System to Generate Hypotheses for Monitoring of Disease Characteristics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 95(5), 496-498. <https://doi.org/10.1038/clpt.2014.17>
- Flores, I., Rivera, E., Ruiz, L. A., Santiago, O. I., Vernon, M. W., & Appleyard, C. B. (2007). Molecular profiling of experimental endometriosis identified gene expression patterns in common with human disease. *Fertility and Sterility*, 87(5), 1180-1199. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.07.1550>
- Friggi Sebe Petrelluzzi, K., Garcia, M. C., Petta, C. A., Ribeiro, D. A., de Oliveira Monteiro, N. R., Céspedes, I. C., & Spadari, R. C. (2012). Physical therapy and psychological intervention normalize cortisol levels and improve vitality in women with endometriosis. *Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology*, 33(4), 191-198. <https://doi.org/10.3109/0167482X.2012.729625>
- Garzon, S., Laganà, A. S., Barra, F., Casarin, J., Cromi, A., Raffaelli, R., Uccella, S., Franchi, M., Ghezzi, F., & Ferrero, S. (2020). Aromatase inhibitors for the treatment of endometriosis: A systematic review about efficacy, safety and early clinical development. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 29(12), 1377-1388. <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1842356>
- Gaulton, A., Hersey, A., Nowotka, M., Bento, A. P., Chambers, J., Mendez, D., Mutowo, P., Atkinson, F., Bellis, L. J., Cibrián-Uhalte, E., Davies, M., Dedman, N., Karlsson, A., Magariños, M. P., Overington, J. P., Papadatos, G., Smit, I., & Leach, A. R. (2017). The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D945-D954. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1074>
- Goh, K.-I., Cusick, M. E., Valle, D., Childs, B., Vidal, M., & Barabási, A.-L. (2007). The human disease network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21), 8685-8690. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701361104>
- Griffiths, R. M., Pru, C. A., Behura, S. K., Cronrath, A. R., McCallum, M. L., Kelp, N. C., Winuthayanon, W., Spencer, T. E., & Pru, J. K. (2020). AMPK IS REQUIRED FOR UTERINE RECEPTIVITY AND NORMAL RESPONSES TO STEROID HORMONES. *Reproduction (Cambridge, England)*, 159(6), 707-717. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0402>
- Grilli, E., Tugnoli, B., Passey, J. L., Stahl, C. H., Piva, A., & Moeser, A. J. (2015). Impact of dietary organic acids and botanicals on intestinal integrity and inflammation in weaned pigs. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0410-0>
- Gulati, S., Cheng, T. M. K., & Bates, P. A. (2013). Cancer networks and beyond: Interpreting mutations using the human interactome and protein structure. *Seminars in Cancer Biology*, 23(4), 219-226. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.05.002>
- Guney, E., Menche, J., Vidal, M., & Barábasi, A.-L. (2016). Network-based in silico drug

- efficacy screening. *Nature Communications*, 7, 10331.
<https://doi.org/10.1038/ncomms10331>
- Güney, M., Oral, B., Karahan, N., & Mungan, T. (2008). Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with melatonin. *Fertility and Sterility*, 89(4), 934-942. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.04.023>
- Guo, S., Wu, J., Zhou, W., Liu, X., Liu, Y., Zhang, J., Jia, S., Li, J., & Wang, H. (2021). Identification and analysis of key genes associated with acute myocardial infarction by integrated bioinformatics methods. *Medicine*, 100(15).
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000025553>
- Guo, S.-W. (2009). Recurrence of endometriosis and its control. *Human Reproduction Update*, 15(4), 441-461. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp007>
- Gupta, C., & Pereira, A. (2019). Recent advances in gene function prediction using context-specific coexpression networks in plants. *F1000Research*, 8, 153.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.17207.1>
- Hamosh, A., Scott, A. F., Amberger, J. S., Bocchini, C. A., & McKusick, V. A. (2005). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Research*, 33(suppl_1), D514-D517.
<https://doi.org/10.1093/nar/gki033>
- Harris, H. R., Eke, A. C., Chavarro, J. E., & Missmer, S. A. (2018). Fruit and vegetable consumption and risk of endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 33(4), 715-727. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey014>
- Hawkins, S. M., & Matzuk, M. M. (2008). The menstrual cycle: Basic biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135, 10-18.
<https://doi.org/10.1196/annals.1429.018>
- Hever, A., Roth, R. B., Hevezi, P., Marin, M. E., Acosta, J. A., Acosta, H., Rojas, J., Herrera, R., Grigoriadis, D., White, E., Conlon, P. J., Maki, R. A., & Zlotnik, A. (2007). Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(30), 12451-12456. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703451104>
- Hewett, M., Oliver, D. E., Rubin, D. L., Easton, K. L., Stuart, J. M., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2002). PharmGKB: The Pharmacogenetics Knowledge Base. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 163-165. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.163>
- Hsin, I.-L., Chou, Y.-H., Hung, W.-L., Ko, J.-L., & Wang, P.-H. (2019). The Application of Arsenic Trioxide in Ameliorating ABT-737 Target Therapy on Uterine Cervical Cancer Cells through Unique Pathways in Cell Death. *Cancers*, 12(1), 108.
<https://doi.org/10.3390/cancers12010108>
- Huang, L.-H., He, Q.-S., Liu, K., Cheng, J., Zhong, M.-D., Chen, L.-S., Yao, L.-X., & Ji, Z.-L. (2018). ADReCS-Target: Target profiles for aiding drug safety research and application. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D911-D917.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx899>
- Huang, S., Ernberg, I., & Kauffman, S. (2009). Cancer attractors: A systems view of tumors from a gene network dynamics and developmental perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(7), 869-876.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.07.003>
- Hubbard, T. (2002). The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 38-41. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.38>
- Hughes, E. G., Fedorkow, D. M., & Collins, J. A. (1993). A quantitative overview of controlled trials in endometriosis-associated infertility*. *Fertility and Sterility*, 59(5), 963-970.

- [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)55911-1](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)55911-1)
- Hull, M. L., Escareno, C. R., Godsland, J. M., Doig, J. R., Johnson, C. M., Phillips, S. C., Smith, S. K., Tavaré, S., Print, C. G., & Charnock-Jones, D. S. (2008). Endometrial-Peritoneal Interactions during Endometriotic Lesion Establishment. *The American Journal of Pathology*, 173(3), 700-715.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071128>
- Hwang, S., Son, S.-W., Kim, S. C., Kim, Y. J., Jeong, H., & Lee, D. (2008). A protein interaction network associated with asthma. *Journal of Theoretical Biology*, 252(4), 722-731. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.02.011>
- Idrissi, F. E., Fruchart, M., Belarbi, K., Lamer, A., Dubois-Deruy, E., Lemdani, M., N'Guessan, A. L., Guinhouya, B. C., & Zitouni, D. (2022). Exploration of the core protein network under endometriosis symptomatology using a computational approach. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.869053>
- Ingelmo, J. M. R., Quereda, F., & Acién, P. (2013). Effect of human interferon-alpha-2b on experimental endometriosis in rats: Comparison between short and long series of treatment. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 167(2), 190-193. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2012.11.019>
- Iorio, F., Bosotti, R., Scacheri, E., Belcastro, V., Mithbaokar, P., Ferriero, R., Murino, L., Tagliaferri, R., Brunetti-Pierri, N., Isacchi, A., & Di Bernardo, D. (2010). Discovery of drug mode of action and drug repositioning from transcriptional responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), 14621-14626.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1000138107>
- Jamali, N., Mostafavi-Pour, Z., Zal, F., Kasraeian, M., Poordast, T., Ramezani, F., & Zare, R. (2019). Combination Effect of Caffeine and Caffeic Acid Treatment on the Oxidant Status of Ectopic Endometrial Cells Separated from Patients with Endometriosis. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 44(4), 315-324.
<https://doi.org/10.30476/IJMS.2019.44970>
- Jankel, C. A., & Fitterman, L. K. (1993). Epidemiology of Drug-Drug Interactions as a Cause of Hospital Admissions: *Drug Safety*, 9(1), 51-59.
<https://doi.org/10.2165/00002018-199309010-00005>
- Johnson, N. P., Hummelshoj, L., Consortium, for the W. E. S. M., Abrao, M. S., Adamson, G. D., Allaire, C., Amelung, V., Andersson, E., Becker, C., Birna Árdal, K. B., Bush, D., de Bie, B., Chwalisz, K., Critchley, H., D'Hooghe, T., Dunselman, G., Evers, J. L. H., Farquhar, C., Faustmann, T., ... Vercellini, P. (2013). Consensus on current management of endometriosis. *Human Reproduction*, 28(6), 1552-1568.
<https://doi.org/10.1093/humrep/det050>
- Ju, W., Li, J., Yu, W., & Zhang, R. (2016). iGraph: An incremental data processing system for dynamic graph. *Frontiers of Computer Science*, 10(3), 462-476.
<https://doi.org/10.1007/s11704-016-5485-7>
- Kagawa, H., Javali, A., Khoei, H. H., Sommer, T. M., Sestini, G., Novatchkova, M., Scholte op Reimer, Y., Castel, G., Bruneau, A., Maenhoudt, N., Lammers, J., Loubersac, S., Freour, T., Vankelecom, H., David, L., & Rivron, N. (2022). Human blastoids model blastocyst development and implantation. *Nature*, 601(7894), Article 7894.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04267-8>
- Kalow, W. (2006). Pharmacogenetics and pharmacogenomics: Origin, status, and the hope for personalized medicine. *The Pharmacogenomics Journal*, 6(3), Article 3.
<https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500361>
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2017). KEGG: New

- perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D353-D361. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>
- Kar, G., Gursoy, A., & Keskin, O. (2009). Human Cancer Protein-Protein Interaction Network: A Structural Perspective. *PLoS Computational Biology*, 5(12), e1000601. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000601>
- Karlebach, G., & Shamir, R. (2008). Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrm2503>
- Katiyar, A., Sharma, S., Singh, T. P., & Kaur, P. (2018). Identification of Shared Molecular Signatures Indicate the Susceptibility of Endometriosis to Multiple Sclerosis. *Frontiers in Genetics*, 9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00042>
- Keller, V., Esber, N., Daraï, É., Bouchard, P., & Chabbert-Buffet, N. (2016). Moduladores selectivos del receptor de la progesterona. *EMC - Ginecología-Obstetricia*, 52(3), 1-6. [https://doi.org/10.1016/S1283-081X\(16\)79133-8](https://doi.org/10.1016/S1283-081X(16)79133-8)
- Khan, M. A., Sengupta, J., Mittal, S., & Ghosh, D. (2012). Genome-wide expressions in autologous eutopic and ectopic endometrium of fertile women with endometriosis. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 10, 84. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-84>
- Khazaei, M. R., Rashidi, Z., Chobsaz, F., Niromand, E., & Khazaei, M. (2020). Inhibitory effect of resveratrol on the growth and angiogenesis of human endometrial tissue in an In Vitro three-dimensional model of endometriosis. *Reproductive Biology*, 20(4), 484-490. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.07.012>
- Khodarahmian, M., Amidi, F., Moini, A., Kashani, L., Salahi, E., Danaii-Mehrabad, S., Nashtaei, M. S., Mojtahedi, M. F., Esfandyari, S., & Sobhani, A. (2021). A randomized exploratory trial to assess the effects of resveratrol on VEGF and TNF- α 2 expression in endometriosis women. *Journal of Reproductive Immunology*, 143, 103248. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2020.103248>
- Kim, Y.-A., Kim, M.-R., Hwang, K.-J., Yoon, J.-H., Seo, S.-S., & Ryu, H.-S. (2002). The clinical efficacy of the low dose aspirin and corticosteroid treatment in patients with endometriosis who underwent in-vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *Korean Journal of Obstetrics and Gynecology*, 431-437.
- Kimber-Trojnar, Ź., Dłuski, D. F., Wierzchowska-Opoka, M., Ruszała, M., & Leszczyńska-Gorzelak, B. (2022). Metformin as a Potential Treatment Option for Endometriosis. *Cancers*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/cancers14030577>
- Kodarahmian, M., Amidi, F., Moini, A., Kashani, L., Shabani Nashtaei, M., Pazhohan, A., Bahramrezai, M., Berenjian, S., & Sobhani, A. (2019). The modulating effects of Resveratrol on the expression of MMP-2 and MMP-9 in endometriosis women: A randomized exploratory trial. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 35(8), 719-726. <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1576612>
- Kolahdouz-Mohammadi, R., Shidfar, F., Khodaverdi, S., Arablou, T., Heidari, S., Rashidi, N., & Delbandi, A.-A. (2021). Resveratrol treatment reduces expression of MCP-1, IL-6, IL-8 and RANTES in endometriotic stromal cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(2), 1116-1127. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16178>
- Kong, X., Xu, X., Zhou, L., Zhu, M., Yao, S., Ding, Y., Liu, T., Wang, Y., Zhang, Y., Li, R., Tang, X., Ling, J., Wu, J., Zhu, X., Gu, Y., & Zhou, H. (2020). MTA1, a Target of Resveratrol, Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition of Endometriosis via ZEB2. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 19, 295-306.

- <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.09.013>
- Konno, R., Fujiwara, H., Netsu, S., Odagiri, K., Shimane, M., Nomura, H., & Suzuki, M. (2007). Gene expression profiling of the rat endometriosis model. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 58(4), 330-343. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00507.x>
- Koutrouli, M., Karatzas, E., Paez-Espino, D., & Pavlopoulos, G. A. (2020). A Guide to Conquer the Biological Network Era Using Graph Theory. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00034>
- Králíčková, M., Laganà, A. S., Ghezzi, F., & Vetvicka, V. (2020). Endometriosis and risk of ovarian cancer: What do we know? *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 301(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s00404-019-05358-8>
- Kuessel, L., Wenzl, R., Proestling, K., Balendran, S., Pateisky, P., Yotova, I., Yerlikaya, G., Streubel, B., & Husslein, H. (2017). Soluble VCAM-1/soluble ICAM-1 ratio is a promising biomarker for diagnosing endometriosis. *Human Reproduction*, 32(4), 770-779. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex028>
- Kuhn, M., Al Banchaabouchi, M., Campillos, M., Jensen, L. J., Gross, C., Gavin, A.-C., & Bork, P. (2013). Systematic identification of proteins that elicit drug side effects. *Molecular Systems Biology*, 9, 663. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.10>
- Kuhn, M., Letunic, I., Jensen, L. J., & Bork, P. (2016). The SIDER database of drugs and side effects. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1075-D1079. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1075>
- Kvaskoff, M., Mahamat-Saleh, Y., Farland, L. V., Shigesu, N., Terry, K. L., Harris, H. R., Roman, H., Becker, C. M., As-Sanie, S., Zondervan, K. T., Horne, A. W., & Missmer, S. A. (2021). Endometriosis and cancer: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 27(2), 393-420. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa045>
- Kvaskoff, M., Mu, F., Terry, K. L., Harris, H. R., Poole, E. M., Farland, L., & Missmer, S. A. (2015). Endometriosis: A high-risk population for major chronic diseases? *Human Reproduction Update*, 21(4), 500-516. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv013>
- L. Bolognesi, M. (2013). *Polypharmacology in a Single Drug: Multitarget Drugs* [Text]. Bentham Science Publishers. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2013/00000020/00000013/art00004>
- Lai, G.-L., Yeh, C.-C., Yeh, C.-Y., Chen, R.-Y., Fu, C.-L., Chen, C.-H., & Tzeng, C.-R. (2017). Decreased zinc and increased lead blood levels are associated with endometriosis in Asian Women. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 74, 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.09.001>
- Lai, H.-W., Wei, J. C.-C., Hung, H.-C., & Lin, C.-C. (2019). Adenine Inhibits the Growth of Colon Cancer Cells via AMP-Activated Protein Kinase Mediated Autophagy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/9151070>
- Lamb, J., Crawford, E. D., Peck, D., Modell, J. W., Blat, I. C., Wrobel, M. J., Lerner, J., Brunet, J.-P., Subramanian, A., Ross, K. N., Reich, M., Hieronymus, H., Wei, G., Armstrong, S. A., Haggarty, S. J., Clemons, P. A., Wei, R., Carr, S. A., Lander, E. S., & Golub, T. R. (2006). The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease. *Science*, 313(5795), 1929-1935. <https://doi.org/10.1126/science.1132939>
- Laschke, M. W., & Menger, M. D. (2012). Anti-angiogenic treatment strategies for the

- therapy of endometriosis. *Human Reproduction Update*, 18(6), 682-702.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dms026>
- Leconte, M., Santulli, P., Chouzenoux, S., Marcellin, L., Cerles, O., Chapron, C., Dousset, B., & Batteux, F. (2015). Inhibition of MAPK and VEGFR by Sorafenib Controls the Progression of Endometriosis. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 22(9), 1171-1180. <https://doi.org/10.1177/1933719115592708>
- Lee, D.-Y., Lee, J.-Y., Seo, J.-W., Yoon, B.-K., & Choi, D. (2016). Gonadotropin-releasing hormone agonist with add-back treatment is as effective and tolerable as dienogest in preventing pain recurrence after laparoscopic surgery for endometriosis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 294(6), 1257-1263.
<https://doi.org/10.1007/s00404-016-4184-9>
- Liu, F., Lv, X., Yu, H., Xu, P., Ma, R., & Zou, K. (2015). In search of key genes associated with endometriosis using bioinformatics approach. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 194, 119-124.
<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2015.08.028>
- Liu, T., Lin, Y., Wen, X., Jorissen, R. N., & Gilson, M. K. (2007). BindingDB: A web-accessible database of experimentally determined protein–ligand binding affinities. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_1), D198-D201.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl999>
- Lounkine, E., Keiser, M. J., Whitebread, S., Mikhailov, D., Hamon, J., Jenkins, J. L., Lavan, P., Weber, E., Doak, A. K., Côté, S., Shoichet, B. K., & Urban, L. (2012). Large-scale prediction and testing of drug activity on side-effect targets. *Nature*, 486(7403), Article 7403. <https://doi.org/10.1038/nature11159>
- Lu, X., Zhang, Q., Xu, L., Lin, X., Fu, J., Wang, X., Liu, Y., Lin, Y., Li, B., Wang, R., Liu, L., Mi, X., Wei, H., Tan, Y., & Fang, Y. (2020). Zinc is essential for the transcription function of the PGC-1 α /Nrf2 signaling pathway in human primary endometrial stromal cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 318(3), C640-C648.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00152.2019>
- Lu, Y., Cuellar-Partida, G., Painter, J. N., Nyholt, D. R., Australian Ovarian Cancer Study, The International Endogene Consortium (IEC), Morris, A. P., Fasching, P. A., Hein, A., Burghaus, S., Beckmann, M. W., Lambrechts, D., Van Nieuwenhuysen, E., Vergote, I., Vanderstichele, A., Doherty, J. A., Rossing, M. A., Wicklund, K. G., Chang-Claude, J., ... Zondervan, K. T. (2015). Shared genetics underlying epidemiological association between endometriosis and ovarian cancer. *Human Molecular Genetics*, 24(20), 5955-5964. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv306>
- Luck, K., Kim, D.-K., Lambourne, L., Spirohn, K., Begg, B. E., Bian, W., Brignall, R., Cafarelli, T., Campos-Laborie, F. J., Charlotiaux, B., Choi, D., Coté, A. G., Daley, M., Deimling, S., Desbuleux, A., Dricot, A., Gebbia, M., Hardy, M. F., Kishore, N., ... Calderwood, M. A. (2020). A reference map of the human binary protein interactome. *Nature*, 580(7803), Article 7803. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2188-x>
- Luddi, A., Pavone, V., Semplici, B., Governini, L., Criscuoli, M., Paccagnini, E., Gentile, M., Morgante, G., De Leo, V., Belmonte, G., Zarovni, N., & Piomboni, P. (2020). Organoids of Human Endometrium: A Powerful In Vitro Model for the Endometrium-Embryo Cross-Talk at the Implantation Site. *Cells*, 9(5), Article 5.
<https://doi.org/10.3390/cells9051121>
- Maia, H., Haddad, C., Pinheiro, N., & Casoy, J. (2012). Advantages of the association of resveratrol with oral contraceptives for management of endometriosis-related pain. *International Journal of Women's Health*, 4, 543-549.

- <https://doi.org/10.2147/IJWH.S36825>
- Mao, X., Zhang, J., Chen, Q., Kuang, Y., & Zhang, S. (2017). Short-term copper intrauterine device placement improves the implantation and pregnancy rates in women with repeated implantation failure. *Fertility and Sterility*, 108(1), 55-61.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.014>
- Masoudi-Sobhanzadeh, Y., Omid, Y., Amanlou, M., & Masoudi-Nejad, A. (2020). Drug databases and their contributions to drug repurposing. *Genomics*, 112(2), 1087-1095. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.06.021>
- Matarese, G., De Placido, G., Nikas, Y., & Alviggi, C. (2003). Pathogenesis of endometriosis: Natural immunity dysfunction or autoimmune disease? *Trends in Molecular Medicine*, 9(5), 223-228. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(03\)00051-0](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(03)00051-0)
- McCallum, M. L., Pru, C. A., Smith, A. R., Kelp, N. C., Foretz, M., Viollet, B., Du, M., & Pru, J. K. (2018). A Functional Role for AMPK in Female Fertility and Endometrial Regeneration. *Reproduction (Cambridge, England)*, REP-18-0372. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0372>
- McGovern, A. J., & Barreto, G. E. (2021). Network pharmacology identifies IL6 as an important hub and target of tibolone for drug repurposing in traumatic brain injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 140, 111769. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111769>
- Menche, J., Sharma, A., Kitsak, M., Ghiassian, S. D., Vidal, M., Loscalzo, J., & Barabasi, A.-L. (2015). Uncovering disease-disease relationships through the incomplete interactome. *Science*, 347(6224), 1257601-1257601. <https://doi.org/10.1126/science.1257601>
- Mencher, S. K., & Wang, L. G. (2005). Promiscuous drugs compared to selective drugs (promiscuity can be a virtue). *BMC Clinical Pharmacology*, 5(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6904-5-3>
- Messalli, E. M., Schettino, M. T., Mainini, G., Ercolano, S., Fuschillo, G., Falcone, F., Esposito, E., Di Donna, M. C., De Franciscis, P., & Torella, M. (2014). The possible role of zinc in the etiopathogenesis of endometriosis. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 41(5), 541-546.
- Mier-Cabrera, J., Aburto-Soto, T., Burrola-Méndez, S., Jiménez-Zamudio, L., Tolentino, M. C., Casanueva, E., & Hernández-Guerrero, C. (2009). Women with endometriosis improved their peripheral antioxidant markers after the application of a high antioxidant diet. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 7, 54. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-54>
- Millan, M. J. (2006). Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacology & Therapeutics*, 110(2), 135-370. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.11.006>
- Mir, O., Ropert, S., Morice, P., & Berveiller, P. (2019). Clinical Activity of Sunitinib and Regorafenib in Endometriosis. *Mayo Clinic Proceedings*, 94(12), 2591-2593. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.10.001>
- Mitsui, Y., Chang, I., Fukuhara, S., Hiraki, M., Arichi, N., Yasumoto, H., Hirata, H., Yamamura, S., Shahryari, V., Deng, G., Wong, D. K., Majid, S., Shiina, H., Dahiya, R., & Tanaka, Y. (2015). CYP1B1 promotes tumorigenesis via altered expression of CDC20 and DAPK1 genes in renal cell carcinoma. *BMC Cancer*, 15(1), 942. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1951-0>
- Moggio, A., Pittatore, G., Cassoni, P., Marchino, G. L., Revelli, A., & Bussolati, B. (2012).

- Sorafenib inhibits growth, migration, and angiogenic potential of ectopic endometrial mesenchymal stem cells derived from patients with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 98(6), 1521-1530.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.08.003>
- Moini, A., Azizlou, Z., Hosseini, R., & Hosseini, L. (2021). The effect of acetylsalicylic acid on pain and recurrence of endometriosis after surgery: A randomized controlled trial. *Journal of Endometriosis and Pelvic Pain Disorders*, 13(4), 288-292. <https://doi.org/10.1177/22840265211049669>
- Montgomery, G. W., Nyholt, D. R., Zhao, Z. Z., Treloar, S. A., Painter, J. N., Missmer, S. A., Kennedy, S. H., & Zondervan, K. T. (2008). The search for genes contributing to endometriosis risk. *Human Reproduction Update*, 14(5), 447-457. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn016>
- Morphy, R. (2010). Selectively Nonselective Kinase Inhibition: Striking the Right Balance. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(4), 1413-1437. <https://doi.org/10.1021/jm901132v>
- Morselli Gysi, D., Do Valle, Í., Zitnik, M., Ameli, A., Gan, X., Varol, O., Ghiassian, S. D., Patten, J. J., Davey, R. A., Loscalzo, J., & Barabási, A.-L. (2021). Network medicine framework for identifying drug-repurposing opportunities for COVID-19. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(19), e2025581118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025581118>
- Nacher, J. C., & Schwartz, J.-M. (2008). A global view of drug-therapy interactions. *BMC Pharmacology*, 8, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-8-5>
- Nasiri, N., Babaei, S., Moini, A., & Eftekhari-Yazdi, P. (2021). Controlling Semi-Invasive Activity of Human Endometrial Stromal Cells by Inhibiting NF-κB Signaling Pathway Using Aloe-emodin and Aspirin. *Journal of Reproduction & Infertility*, 22(4), 227-240. <https://doi.org/10.18502/jri.v22i4.7648>
- Ngô, C., Chéreau, C., Nicco, C., Weill, B., Chapron, C., & Batteux, F. (2009). Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *The American Journal of Pathology*, 175(1), 225-234. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080804>
- Nithya, C., Kiran, M., & Nagarajaram, H. A. (2023). Dissection of hubs and bottlenecks in a protein-protein interaction network. *Computational Biology and Chemistry*, 102, 107802. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2022.107802>
- Nitsch, D., Tranchevent, L.-C., Thienpont, B., Thorrez, L., Van Esch, H., Devriendt, K., & Moreau, Y. (2009). Network analysis of differential expression for the identification of disease-causing genes. *PloS One*, 4(5), e5526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005526>
- Nnoaham, K. E., Hummelshoj, L., Webster, P., d'Hooghe, T., de Cicco Nardone, F., de Cicco Nardone, C., Jenkinson, C., Kennedy, S. H., Zondervan, K. T., & World Endometriosis Research Foundation Global Study of Women's Health consortium. (2011). Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: A multicenter study across ten countries. *Fertility and Sterility*, 96(2), 366-373.e8. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.05.090>
- Nyholt, D. R., Gillespie, N. G., Merikangas, K. R., Treloar, S. A., Martin, N. G., & Montgomery, G. W. (2009). Common genetic influences underlie comorbidity of migraine and endometriosis. *Genetic Epidemiology*, 33(2), 105-113. <https://doi.org/10.1002/gepi.20361>
- Ohlsson Teague, E. M. C., Van der Hoek, K. H., Van der Hoek, M. B., Perry, N., Wagaarachchi, P., Robertson, S. A., Print, C. G., & Hull, L. M. (2009). MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 23(2), 265-275.

- <https://doi.org/10.1210/me.2008-0387>
- Onuma, T., Mizutani, T., Fujita, Y., Ohgami, N., Ohnuma, S., Kato, M., & Yoshida, Y. (2023). Zinc deficiency is associated with the development of ovarian endometrial cysts. *American Journal of Cancer Research*, 13(3), 1049-1066.
- Oti, M., Snel, B., Huynen, M. A., & Brunner, H. G. (2006). Predicting disease genes using protein-protein interactions. *Journal of Medical Genetics*, 43(8), 691-698. <https://doi.org/10.1136/jmg.2006.041376>
- Ozcan Cenksoy, P., Oktem, M., Erdem, O., Karakaya, C., Cenksoy, C., Erdem, A., Guner, H., & Karabacak, O. (2015). A potential novel treatment strategy: Inhibition of angiogenesis and inflammation by resveratrol for regression of endometriosis in an experimental rat model. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 31(3), 219-224. <https://doi.org/10.3109/09513590.2014.976197>
- Ozer, H., Boztosun, A., Açmaz, G., Atilgan, R., Akkar, O. B., & Kosar, M. I. (2013). The efficacy of bevacizumab, sorafenib, and retinoic acid on rat endometriosis model. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 20(1), 26-32. <https://doi.org/10.1177/1933719112452941>
- Parazzini, F., Chiaffarino, F., Surace, M., Chatenoud, L., Cipriani, S., Chiantera, V., Benzi, G., & Fedele, L. (2004). Selected food intake and risk of endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 19(8), 1755-1759. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh395>
- Parazzini, F., Viganò, P., Candiani, M., & Fedele, L. (2013). Diet and endometriosis risk: A literature review. *Reproductive BioMedicine Online*, 26(4), 323-336. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.12.011>
- Parkinson, H., Kapushesky, M., Shojatalab, M., Abeygunawardena, N., Coulson, R., Farne, A., Holloway, E., Kolesnykov, N., Lilja, P., Lukk, M., Mani, R., Rayner, T., Sharma, A., William, E., Sarkans, U., & Brazma, A. (2007). ArrayExpress—A public database of microarray experiments and gene expression profiles. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_1), D747-D750. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl995>
- Parvathaneni, V., Kulkarni, N. S., Muth, A., & Gupta, V. (2019). Drug repurposing: A promising tool to accelerate the drug discovery process. *Drug Discovery Today*, 24(10), 2076-2085. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.06.014>
- Pérez Edo, L. (2004). Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERM). *Revista Española de Reumatología*, 31(1), 13-17.
- Piccinato, C. A., Neme, R. M., Torres, N., Sanches, L. R., Derogis, P. B. M. C., Brudniewski, H. F., Silva, J. C. R. e, & Ferriani, R. A. (2016). Increased expression of CYP1A1 and CYP1B1 in ovarian/peritoneal endometriotic lesions. *Reproduction*, 151(6), 683-692. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0581>
- Porpora, M. G., Brunelli, R., Costa, G., Imperiale, L., Krasnowska, E. K., Lundeberg, T., Nofroni, I., Piccioni, M. G., Pittaluga, E., Ticino, A., & Parasassi, T. (2013). A promise in the treatment of endometriosis: An observational cohort study on ovarian endometrioma reduction by N-acetylcysteine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2013, 240702. <https://doi.org/10.1155/2013/240702>
- Porpora, M. G., Resta, S., Fuggetta, E., Storelli, P., Megiorni, F., Manganaro, L., & De Felip, E. (2013). Role of environmental organochlorinated pollutants in the development of endometriosis. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 40(4), 565-567.
- Prati, F., Uliassi, E., & Bolognesi, M. L. (2014). Two diseases, one approach: Multitarget drug discovery in Alzheimer's and neglected tropical diseases. *MedChemComm*, 5(7),

- 853-861. <https://doi.org/10.1039/C4MD00069B>
- Rahmioglu, N., Nyholt, D. R., Morris, A. P., Missmer, S. A., Montgomery, G. W., & Zondervan, K. T. (2014). Genetic variants underlying risk of endometriosis: Insights from meta-analysis of eight genome-wide association and replication datasets. *Human Reproduction Update*, 20(5), 702-716. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu015>
- Ramachandran, N., Raphael, J. V., Hainsworth, E., Demirkan, G., Fuentes, M. G., Rolfs, A., Hu, Y., & LaBaer, J. (2008). Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays. *Nature Methods*, 5(6), 535-538. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1210>
- Ramírez-González, J. A., Vaamonde-Lemos, R., Cunha-Filho, J. S., Varghese, A. C., & Swanson, R. J. (2016). Overview of the Female Reproductive System. En D. Vaamonde, S. S. Du Plessis, & A. Agarwal (Eds.), *Exercise and Human Reproduction* (pp. 19-46). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3402-7_2
- Ramos, E. M., Hoffman, D., Junkins, H. A., Maglott, D., Phan, L., Sherry, S. T., Feolo, M., & Hindorff, L. A. (2014). Phenotype–Genotype Integrator (PheGenI): Synthesizing genome-wide association study (GWAS) data with existing genomic resources. *European Journal of Human Genetics*, 22(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.96>
- Ricci, A. G., Olivares, C. N., Bilotas, M. A., Bastón, J. I., Singla, J. J., Meresman, G. F., & Barañao, R. I. (2013). Natural therapies assessment for the treatment of endometriosis. *Human Reproduction*, 28(1), 178-188. <https://doi.org/10.1093/humrep/des369>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47-e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rolland, T., Taşan, M., Charlotteaux, B., Pevzner, S. J., Zhong, Q., Sahni, N., Yi, S., Lemmens, I., Fontanillo, C., Mosca, R., Kamburov, A., Ghiassian, S. D., Yang, X., Ghamsari, L., Balcha, D., Begg, B. E., Braun, P., Brehme, M., Broly, M. P., ... Vidal, M. (2014). A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell*, 159(5), 1212-1226. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.050>
- Romano, A., Xanthoulea, S., Giacomini, E., Delvoux, B., Alleva, E., & Vigano, P. (2020). Endometriotic cell culture contamination and authenticity: A source of bias in in vitro research? *Human Reproduction (Oxford, England)*, 35(2), 364-376. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez266>
- Rual, J.-F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G. F., Gibbons, F. D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., Klitgord, N., Simon, C., Boxem, M., Milstein, S., Rosenberg, J., Goldberg, D. S., Zhang, L. V., Wong, S. L., Franklin, G., ... Vidal, M. (2005). Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*, 437(7062), 1173-1178. <https://doi.org/10.1038/nature04209>
- Rudзитis-Auth, J., Menger, M. D., & Laschke, M. W. (2013). Resveratrol is a potent inhibitor of vascularization and cell proliferation in experimental endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(5), 1339-1347. <https://doi.org/10.1093/humrep/det031>

- Saad-Hossne, R., Barretto, A. B., Siqueira, J. M., & Denadai, R. (2016). Evaluation of peritoneal endometriosis treatment using intralesional acetylsalicylic acid injection in rabbits. *Acta Cirurgica Brasileira*, 31(4), 227-234. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020160040000002>
- Safari-Alighiarloo, N., Rezaei-Tavirani, M., Taghizadeh, M., Tabatabaei, S. M., & Namaki, S. (2016). Network-based analysis of differentially expressed genes in cerebrospinal fluid (CSF) and blood reveals new candidate genes for multiple sclerosis. *PeerJ*, 4, e2775. <https://doi.org/10.7717/peerj.2775>
- Safari-Alighiarloo, N., Taghizadeh, M., Rezaei-Tavirani, M., Goliaei, B., & Peyvandi, A. A. (2014). Protein-protein interaction networks (PPI) and complex diseases. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 7(1), 17-31.
- Saha, R., Pettersson, H. J., Svedberg, P., Olovsson, M., Bergqvist, A., Marions, L., Tornvall, P., & Kuja-Halkola, R. (2015). Heritability of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 104(4), 947-952. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.06.035>
- Saiti, A., Giannopoulos-Dimitriou, A., Kazakos, I., Galatou, E., & Vizirianakis, I. S. (2023). Systems Pharmacology and Network Analysis to Advance Pharmacogenomics and Precision Medicine Decisions in Type-2 Diabetes Therapy. *Future Pharmacology*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol3010021>
- Samimi, M., Pourhanifeh, M. H., Mehdizadehkashi, A., Eftekhar, T., & Asemi, Z. (2019). The role of inflammation, oxidative stress, angiogenesis, and apoptosis in the pathophysiology of endometriosis: Basic science and new insights based on gene expression. *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), 19384-19392. <https://doi.org/10.1002/jcp.28666>
- Saraswat, L., Ayansina, D., Cooper, K. G., Bhattacharya, S., Horne, A. W., & Bhattacharya, S. (2018). Impact of endometriosis on risk of further gynaecological surgery and cancer: A national cohort study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 125(1), 64-72. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.14793>
- Schink, M., Konturek, P. C., Herbert, S. L., Renner, S. P., Burghaus, S., Blum, S., Fasching, P. A., Neurath, M. F., & Zopf, Y. (2019). Different nutrient intake and prevalence of gastrointestinal comorbidities in women with endometriosis. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 70(2). <https://doi.org/10.26402/jpp.2019.2.09>
- Schutt, A. K., Atkins, K. A., Slack-Davis, J. K., & Stovall, D. W. (2015). VCAM-1 on Peritoneum and $\alpha 4 \beta 1$ Integrin in Endometrium and Their Implications in Endometriosis. *International Journal of Gynecological Pathology*, 34(1), 85. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000118>
- Scutiero, G., Iannone, P., Bernardi, G., Bonaccorsi, G., Spadaro, S., Volta, C. A., Greco, P., & Nappi, L. (2017). Oxidative Stress and Endometriosis: A Systematic Review of the Literature. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2017/7265238>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Sharma, I., Dhawan, V., Mahajan, N., Saha, S. C., & Dhaliwal, L. K. (2010). In vitro effects of atorvastatin on lipopolysaccharide-induced gene expression in endometriotic stromal cells. *Fertility and Sterility*, 94(5), 1639-1646.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.003>

- Sharma, S., Tripathi, A., Sharma, S., & Tripathi, A. (2022). *Endometriosis: The Enigma That It Continues to Be*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.108774>
- Shuai, K. (2000). Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene*, 19(21), 2638-2644. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203522>
- Simoens, S., Hummelshoj, L., Dunselman, G., Brandes, I., Dirksen, C., D'Hooghe, T., & EndoCost Consortium. (2011). Endometriosis cost assessment (the EndoCost study): A cost-of-illness study protocol. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 71(3), 170-176. <https://doi.org/10.1159/000316055>
- Simoens, S., Meuleman, C., & D'Hooghe, T. (2011). Non-health-care costs associated with endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 26(9), 2363-2367. <https://doi.org/10.1093/humrep/der215>
- Singh, A. K., Chattopadhyay, R., Chakravarty, B., & Chaudhury, K. (2013). Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 42, 116-124. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.005>
- Singh, P., Ravanan, P., & Talwar, P. (2016). Death Associated Protein Kinase 1 (DAPK1): A Regulator of Apoptosis and Autophagy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00046>
- Siqueira, J. M., Barreto, A. B., & Saad-Hossne, R. (2011). Treatment of endometriosis with local acetylsalicylic acid injection: Experimental study in rabbits. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 18(6), 800-806. <https://doi.org/10.1016/j.jmig.2011.08.721>
- Skalnaya, M. G., Tinkov, A. A., Lobanova, Y. N., Chang, J.-S., & Skalny, A. V. (2019). Serum levels of copper, iron, and manganese in women with pregnancy, miscarriage, and primary infertility. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 56, 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.08.009>
- Skrabanek, L., Saini, H. K., Bader, G. D., & Enright, A. J. (2008). Computational Prediction of Protein-Protein Interactions. *Molecular Biotechnology*, 38(1), 1-17. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0069-2>
- Sollis, E., Mosaku, A., Abid, A., Buniello, A., Cerezo, M., Gil, L., Groza, T., Güneş, O., Hall, P., Hayhurst, J., Ibrahim, A., Ji, Y., John, S., Lewis, E., MacArthur, J. A. L., McMahon, A., Osumi-Sutherland, D., Panoutsopoulou, K., Pendlington, Z., ... Harris, L. W. (2023). The NHGRI-EBI GWAS Catalog: Knowledgebase and deposition resource. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D977-D985. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1010>
- Soltan, M. H., & Jenkins, D. M. (1983). Plasma copper and zinc concentrations and infertility. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 90(5), 457-459. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1983.tb08944.x>
- Song, Z., Gao, P., Zhong, X., Li, M., Wang, M., & Song, X. (2022). Identification of Five Hub Genes Based on Single-Cell RNA Sequencing Data and Network Pharmacology in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Frontiers in Public Health*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.894129>
- Stark, C., Breitkreutz, B.-J., Reguly, T., Boucher, L., Breitkreutz, A., & Tyers, M. (2006). BioGRID: A general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl_1), D535-D539. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj109>
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Chapman, M., Evans, K., Azevedo, L., Hayden, M., Heywood, S., Millar, D. S., Phillips, A. D., & Cooper, D. N. (2020). The Human Gene Mutation Database (HGMD®): Optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. *Human Genetics*, 139(10), 1197-1207.

<https://doi.org/10.1007/s00439-020-02199-3>

- Strebhardt, K., & Ullrich, A. (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer*, 8(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nrc2394>
- Su, C., Liu, W.-X., Wu, L.-S., Dong, T.-J., & Liu, J.-F. (2021). Screening of Hub Gene Targets for Lung Cancer via Microarray Data. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 24(2), 269-285. <https://doi.org/10.2174/1386207323666200808172631>
- Suardika, A., & Astawa Pemayun, T. G. (2018). New insights on the pathogenesis of endometriosis and novel non-surgical therapies. *Journal of the Turkish-German Gynecological Association*, 19(3), 158-164. <https://doi.org/10.4274/jtgga.2018.0090>
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: Protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D638-D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- Szklarczyk, D., Santos, A., von Mering, C., Jensen, L. J., Bork, P., & Kuhn, M. (2016). STITCH 5: Augmenting protein–chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D380-D384. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1277>
- Taguchi, A., Koga, K., Kawana, K., Makabe, T., Sue, F., Miyashita, M., Yoshida, M., Urata, Y., Izumi, G., Tkamura, M., Harada, M., Hirata, T., Hirota, Y., Wada-Hiraike, O., Fujii, T., & Osuga, Y. (2016). Resveratrol Enhances Apoptosis in Endometriotic Stromal Cells. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 75(4), 486-492. <https://doi.org/10.1111/aji.12489>
- Taguchi, A., Wada-Hiraike, O., Kawana, K., Koga, K., Yamashita, A., Shirane, A., Urata, Y., Kozuma, S., Osuga, Y., & Fujii, T. (2014). Resveratrol suppresses inflammatory responses in endometrial stromal cells derived from endometriosis: A possible role of the sirtuin 1 pathway. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 40(3), 770-778. <https://doi.org/10.1111/jog.12252>
- Tajti, F., Kuppe, C., Antoranz, A., Ibrahim, M. M., Kim, H., Ceccarelli, F., Holland, C. H., Olauson, H., Floege, J., Alexopoulos, L. G., Kramann, R., & Saez-Rodriguez, J. (2020). A Functional Landscape of CKD Entities From Public Transcriptomic Data. *Kidney International Reports*, 5(2), 211-224. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2019.11.005>
- Takiguchi, E., Nishimura, M., Minoda, A., Kawakita, T., Abe, A., & Irahara, M. (2017). Growth inhibitory effect of the Src inhibitor dasatinib in combination with anticancer agents on uterine cervical adenocarcinoma cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(5), 4293-4299. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5061>
- Tamareis, J. S., Irwin, J. C., Goldfien, G. A., Rabban, J. T., Burney, R. O., Nezhat, C., DePaolo, L. V., & Giudice, L. C. (2014). Molecular classification of endometriosis and disease stage using high-dimensional genomic data. *Endocrinology*, 155(12), 4986-4999. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1490>
- Taniguchi, F., Higaki, H., Azuma, Y., Deura, I., Iwabe, T., Harada, T., & Terakawa, N. (2013). Gonadotropin-releasing hormone analogues reduce the proliferation of endometrial stromal cells but not endometriotic cells. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 75(1), 9-15. <https://doi.org/10.1159/000343748>
- Terzi, H., Mustafa, E., Ergül, M., Ahmet, A., & Mehmet, S. (2019). *Proteasome Inhibitor Carfilzomib Enhances the Anticancer Effect of Paclitaxel in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. | Indian Journal of Pharmaceutical Sciences | EBSCOhost*. <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.616>

- Tian, X., & Diaz, F. J. (2012). Zinc depletion causes multiple defects in ovarian function during the periovulatory period in mice. *Endocrinology*, 153(2), 873-886. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1599>
- Treloar, S. A., O'Connor, D. T., O'Connor, V. M., & Martin, N. G. (1999). Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample. *sueT@qimr.edu.au. Fertility and Sterility*, 71(4), 701-710. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(98\)00540-8](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(98)00540-8)
- Turanli, B., Altay, O., Borén, J., Turkez, H., Nielsen, J., Uhlen, M., Arga, K. Y., & Mardinoglu, A. (2021). Systems biology based drug repositioning for development of cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 68, 47-58. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.09.020>
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Sziggyarto, C. A.-K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., ... Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220), 1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- Van Norman, G. A. (2016). Drugs, Devices, and the FDA: Part 1. *JACC: Basic to Translational Science*, 1(3), 170-179. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.03.002>
- Van Rossum, Guido & Drake. (2019). *Python 3 Reference Manual: Vol. CreateSpac. Create Space*.
- Venkatesan, K., Rual, J.-F., Vazquez, A., Stelzl, U., Lemmens, I., Hirozane-Kishikawa, T., Hao, T., Zenkner, M., Xin, X., Goh, K.-I., Yildirim, M. A., Simonis, N., Heinzmann, K., Gebreab, F., Sahalie, J. M., Cevik, S., Simon, C., de Smet, A.-S., Dann, E., ... Vidal, M. (2009). An empirical framework for binary interactome mapping. *Nature methods*, 6(1), 83-90. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1280>
- Vercellini, P., Somigliana, E., Viganò, P., Abbiati, A., Dagupati, R., & Crosignani, P. G. (2008). Endometriosis: Current and future medical therapies. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 22(2), 275-306. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2007.10.001>
- Vercellini, P., Viganò, P., Somigliana, E., & Fedele, L. (2014). Endometriosis: Pathogenesis and treatment. *Nature Reviews. Endocrinology*, 10(5), 261-275. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.255>
- Verkauf, B. S. (1987). Incidence, symptoms, and signs of endometriosis in fertile and infertile women. *The Journal of the Florida Medical Association*, 74(9), 671-675.
- Viacava Follis, A. (2021). Centrality of drug targets in protein networks. *BMC Bioinformatics*, 22(1), 527. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04342-x>
- Vidal, M. (2016). How much of the human protein interactome remains to be mapped? *Science Signaling*, 9(427), eg7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf6030>
- Vilar, S., Uriarte, E., Santana, L., Lorberbaum, T., Hripcsak, G., Friedman, C., & Tatonetti, N. P. (2014). Similarity-based modeling in large-scale prediction of drug-drug interactions. *Nature Protocols*, 9(9), 2147-2163. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.151>
- Wang, C., Chen, Z., Zhao, X., Lin, C., Hong, S., Lou, Y., Shi, X., Zhao, M., Yang, X., Guan, M.-X., & Xi, Y. (2021). Transcriptome-Based Analysis Reveals Therapeutic Effects of Resveratrol on Endometriosis in a Rat Model. *Drug Design, Development and Therapy*, 15, 4141-4155. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S323790>
- Wang, L., Zhang, J., Zhang, H., Li, R., Li, C., Zhao, X., & Li, M. (2021). Low-dose aspirin can downregulate progesterone resistance and increase the expression of LIF in endometriosis during the implantation window. *Gynecological Endocrinology: The*

- Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 37(8), 725-729. <https://doi.org/10.1080/09513590.2021.1918663>
- Wang, X., Gulbahce, N., & Yu, H. (2011). Network-based methods for human disease gene prediction. *Briefings in Functional Genomics*, 10(5), 280-293. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elr024>
- Wang, Y., Xiao, J., Suzek, T. O., Zhang, J., Wang, J., & Bryant, S. H. (2009). PubChem: A public information system for analyzing bioactivities of small molecules. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl_2), W623-W633. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp456>
- Wang, Z., Liu, J., Li, M., Lian, L., Cui, X., Ng, T.-W., & Zhu, M. (2022). Integrated bioinformatics analysis uncovers characteristic genes and molecular subtyping system for endometriosis. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 932526. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.932526>
- Wei, J., Zhao, B., Zhang, C., Shen, B., Zhang, Y., Li, C., & Chen, Y. (2019). Jiawei Foshou San Induces Apoptosis in Ectopic Endometrium Based on Systems Pharmacology, Molecular Docking, and Experimental Evidence. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2360367>
- Wilcox, A. J., Baird, D. D., & Weinberg, C. R. (1999). Time of Implantation of the Conceptus and Loss of Pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 340(23), 1796-1799. <https://doi.org/10.1056/NEJM199906103402304>
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., Maciejewski, A., Gale, N., Wilson, A., Chin, L., Cummings, R., Le, D., ... Wilson, M. (2018). DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D1074-D1082. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>
- Xiao, H., Yang, L., Liu, J., Jiao, Y., Lu, L., & Zhao, H. (2017). Protein-protein interaction analysis to identify biomarker networks for endometriosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5185>
- Xiao, Y., Duan, Y., Wang, Y., & Yin, X. (2021). Resveratrol suppresses malignant progression of oral squamous cell carcinoma cells by inducing the ZNF750/RAC1 signaling pathway. *Bioengineered*, 12(1), 2863-2873. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1940616>
- Xu, Z., Zhao, F., Lin, F., Chen, J., & Huang, Y. (2012). Lipoxin A4 inhibits the development of endometriosis in mice: The role of anti-inflammation and anti-angiogenesis. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 67(6), 491-497. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01101.x>
- Yamagata, Y., Takaki, E., Shinagawa, M., Okada, M., Jozaki, K., Lee, L., Sato, S., Maekawa, R., Taketani, T., Asada, H., Tamura, H., Nakai, A., & Sugino, N. (2015). Retinoic acid has the potential to suppress endometriosis development. *Journal of Ovarian Research*, 8, 49. <https://doi.org/10.1186/s13048-015-0179-6>
- Yang, W., Wang, L., Wang, F., & Yuan, S. (2020). Roles of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) in Mammalian Reproduction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593005>
- Yang, X., Coulombe-Huntington, J., Kang, S., Sheynkman, G. M., Hao, T., Richardson, A., Sun, S., Yang, F., Shen, Y. A., Murray, R. R., Spirohn, K., Begg, B. E., Duran-Frigola, M., MacWilliams, A., Pevzner, S. J., Zhong, Q., Wanamaker, S. A., Tam, S., Ghamsari, L., ... Vidal, M. (2016). Widespread expansion of protein interaction capabilities by alternative splicing. *Cell*, 164(4), 805-817. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.029>

- Yao, Z., Shen, X., Capodanno, I., Donnelly, M., Fenyk-Melody, J., Hausamann, J., Nunes, C., Strauss, J., & Vakerich, K. (2005). Validation of rat endometriosis model by using raloxifene as a positive control for the evaluation of novel SERM compounds. *Journal of Investigative Surgery: The Official Journal of the Academy of Surgical Research*, 18(4), 177-183. <https://doi.org/10.1080/08941930591004412>
- Yavuz, S., Aydin, N. E., Celik, O., Yilmaz, E., Ozerol, E., & Tanbek, K. (2014). Resveratrol successfully treats experimental endometriosis through modulation of oxidative stress and lipid peroxidation. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(2), 324-329. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.136619>
- Yildirim, M. A., Goh, K.-I., Cusick, M. E., Barabási, A.-L., & Vidal, M. (2007). Drug-target network. *Nature Biotechnology*, 25(10), 1119-1126. <https://doi.org/10.1038/nbt1338>
- Yip, V., Hawcutt, D., & Pirmohamed, M. (2015). Pharmacogenetic Markers of Drug Efficacy and Toxicity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 98(1), 61-70. <https://doi.org/10.1002/cpt.135>
- Youdim, M. B. H., & Buccafusco, J. J. (2005). Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(1), 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.11.007>
- Yu, H., Kim, P. M., Sprecher, E., Trifonov, V., & Gerstein, M. (2007). The importance of bottlenecks in protein networks: Correlation with gene essentiality and expression dynamics. *PLoS Computational Biology*, 3(4), e59. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030059>
- Yu, H., Tardivo, L., Tam, S., Weiner, E., Gebreab, F., Fan, C., Svrikapa, N., Hirozane-Kishikawa, T., Rietman, E., Yang, X., Sahalie, J., Salehi-Ashtiani, K., Hao, T., Cusick, M. E., Hill, D. E., Roth, F. P., Braun, P., & Vidal, M. (2011). Next-generation sequencing to generate interactome datasets. *Nature Methods*, 8(6), 478-480. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1597>
- Yu, L., Shen, H., Ren, X., Wang, A., Zhu, S., Zheng, Y., & Wang, X. (2021). Multi-omics analysis reveals the interaction between the complement system and the coagulation cascade in the development of endometriosis. *Scientific Reports*, 11(1), 11926. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90112-x>
- Zamanian Azodi, M., Peyvandi, H., Rostami-Nejad, M., Safaei, A., Rostami, K., Vafaei, R., Heidari, M., Hosseini, M., & Zali, M. R. (2016). Protein-protein interaction network of celiac disease. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 9(4), 268-277.
- Zhao, L., Gu, C., Ye, M., Zhang, Z., Li, L., Fan, W., & Meng, Y. (2018). Integration analysis of microRNA and mRNA paired expression profiling identifies deregulated microRNA-transcription factor-gene regulatory networks in ovarian endometriosis. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 16(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0319-5>
- Zhou, B., Wang, R., Wu, P., & Kong, D. (2015). Drug Repurposing Based on Drug-Drug Interaction. *Chemical Biology & Drug Design*, 85(2), 137-144. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12378>
- Zhou, C., Boggess, J. F., Bae-Jump, V., & Gehrig, P. A. (2007). Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by arsenic trioxide (As₂O₃) in endometrial carcinoma cells. *Gynecologic Oncology*, 105(1), 218-222. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.11.027>
- Zhou, Y., Wang, K., Zhen, S., Wang, R., & Luo, W. (2016). Carfilzomib induces G2/M cell cycle arrest in human endometrial cancer cells via upregulation of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 55(6), 847-851.

<https://doi.org/10.1016/j.tjog.2016.09.003>