

**MÁSTER UNIVERSITARIO DE BIOINFORMÁTICA, BIOLOGÍA
COMPUTACIONAL Y MEDICINA PERSONALIZADA**



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

**REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS BASADO EN EL
TRANSCRIPTOMA PARA LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

AUTORA: PAU CAMILLERI LLEDÓ

**TUTORES: FRANCISCO GARCÍA GARCÍA
CRISTINA GALIANA ROSELLÓ**

DICIEMBRE 2023

Índice

Resumen.....	3
Abstract.....	4
1. Introducción.....	5
1.1. La enfermedad de Alzheimer.....	5
1.1.1 Epidemiología.....	7
1.1.2 Factores de riesgo genético.....	7
1.1.3 Factores de riesgo modificables.....	8
1.1.4 Tratamiento farmacológico.....	8
1.1.5 Nuevas estrategias terapéuticas.....	9
1.2. Reposicionamiento o reutilización de fármacos.....	9
1.2.1. Principios de reposicionamiento de fármacos.....	12
1.2.2. Aproximaciones computacionales.....	14
1.3. Medicina personalizada y de precisión en la enfermedad de Alzheimer: El sexo como factor esencial.....	15
2. Objetivos.....	17
3. Materiales y Métodos.....	18
3.1. SignatureSearch.....	18
3.1.1. Bases de datos de referencia.....	20
3.1.2. Enriquecimiento funcional.....	22
3.2. Perfiles de expresión diferencial de pacientes con enfermedad de Alzheimer.....	25
4. Resultados.....	27
4.1 Conectividad enfermedad-fármaco.....	27
4.1.1 Fármacos identificados en el córtex.....	27
4.1.2 Fármacos identificados en el hipocampo.....	35
5. Discusión.....	41
6. Conclusiones.....	45
7. BIBLIOGRAFÍA.....	46
8. Índice de tablas.....	53
9. Índice de Figuras.....	54

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo más común de demencia y puede definirse como una enfermedad neurodegenerativa con una progresión lenta, caracterizada por la formación de placas beta-amiloide ($A\beta$) y ovillos neurofibrilares. En el mundo se estima que existen más de 40 millones de personas que padecen la enfermedad y se espera que las personas afectadas aumenten a más de 100 millones en 2050. Las mujeres son las que más padecen esta enfermedad, presentando la EA un claro dimorfismo sexual en su diagnóstico, pronóstico y progresión. En la actualidad no existe ningún fármaco efectivo, existiendo solo fármacos para el tratamiento sintomático de la enfermedad. El objetivo principal de este proyecto es identificar nuevas posibles dianas para el tratamiento de la EA, mediante el uso del reposicionamiento o reutilización *in silico* de fármacos considerando la variable sexo como determinante hacia una medicina personalizada y de precisión. Para ello se realizó un análisis de correlación entre los perfiles de expresión diferencial consenso del córtex e hipocampo de hombres y mujeres con EA, y los perfiles de expresión diferencial de diferentes líneas celulares tratadas con fármacos depositados en LINCS. Las diferentes correlaciones, por sexo y región cerebral, se realizaron mediante las diferentes funcionalidades que ofrece el paquete de trabajo SignatureSearch en R. En el caso del hipocampo se observa que las diferencias por sexo son más notorias que en el córtex, puesto que en esta región sí que existen 4 fármacos que coinciden en hombres y mujeres. Además, se han identificado mecanismos de acción (MOA) específicos para cada sexo, como son los inhibidores de las histonas deacetilasas, identificadas solo para los hombres. Con los resultados obtenidos en el proyecto, se obtienen nuevas indicaciones para fármacos, así como proporcionar más evidencias del dimorfismo sexual presente en la EA, contribuyendo a aportar evidencias de la necesidad de realizar tratamientos en función del sexo.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia and can be defined as a slowly progressive neurodegenerative disease characterised by the formation of beta-amyloid (A β) plaques and neurofibrillary tangles. Worldwide, it is estimated that there are more than 40 million people with the disease and the number of people affected is expected to increase to more than 100 million by 2050. Women are the main sufferers, with AD showing a clear sexual dimorphism in its diagnosis, prognosis and progression. At present, there is no effective drug, and there are only drugs for symptomatic treatment of the disease. The main objective of this project is to identify new potential targets for the treatment of AD by using *in silico* drug repositioning or reuse, considering the sex variable as a determinant towards personalised and precision medicine. For this purpose, a correlation analysis was carried out between the differential expression profiles of the cortex and hippocampus of men and women with AD, and the differential expression profiles of different cell lines treated with drugs deposited in LINCS. The different correlations, by sex and brain region, were carried out using the different functionalities offered by the SignatureSearch work package in R. In the case of the hippocampus, the differences by sex are more noticeable than in the cortex, since in this region there are 4 drugs that coincide in men and women. In addition, sex-specific mechanisms of action (MOA) have been identified, such as inhibitors of histone deacetylases, identified only for men. With the results obtained in the project, new indications for drugs are obtained, as well as providing more evidence of the sexual dimorphism present in AD, contributing to providing evidence of the need for sex-specific treatments.

1. Introducción

La demencia es un término general asociado a varias enfermedades de naturaleza crónica y progresiva, que resultan en el deterioro de la función cognitiva (es decir, la capacidad para procesar el pensamiento) más allá de lo que podría considerarse una consecuencia habitual del envejecimiento biológico. Si bien la conciencia no se ve afectada, el deterioro de la función cognitiva suele ir acompañado, y en ocasiones precedido, por cambios en el estado de ánimo, el control emocional, el comportamiento o la motivación. La demencia tiene consecuencias físicas, psicológicas, sociales y económicas, no solo para las personas que viven con la enfermedad, sino también para sus cuidadores, las familias y la sociedad en general. A menudo hay una falta de concienciación y de comprensión de la demencia, lo que puede causar estigmatización y suponer un obstáculo para el diagnóstico y la atención. Actualmente, más de 55 millones de personas tienen demencia en todo el mundo, además, se estima que cada año hay casi diez millones de casos nuevos. La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia y puede representar entre un 60% y un 70% de los casos.

1.1. La enfermedad de Alzheimer

La EA (llamada así tras su descubrimiento por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer) es el tipo más común de demencia y puede definirse como una enfermedad neurodegenerativa con una progresión lenta, caracterizada por el depósito de placas como consecuencia de la acumulación del péptido beta-amiloide ($A\beta$) y la formación de ovillos neurofibrilares en la zona más afectada del cerebro, el lóbulo temporal medio y las estructuras neocorticales (Figura 1).

La patogenia de la enfermedad es compleja; no obstante, se acepta que, en términos generales, la enfermedad de Alzheimer se distingue por manifestar las siguientes anomalías histopatológicas distintivas (aunque no son las exclusivas) [1]:

1. **Depósitos de proteína β -amiloide ($A\beta$):** Se producen debido a que la proteína precursora amiloide transmembrana (APP) es escindida produciendo los depósitos de $A\beta$, siendo las enzimas de escisión proteolítica como la β -secretasa y la γ -secretasa las responsables de la biosíntesis de los depósitos de $A\beta$. Las placas amiloides son acumulaciones extracelulares principalmente compuestas de $A\beta$ con 40 o 42 aminoácidos ($A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$) anormalmente plegados, dos subproductos del metabolismo de la APP. El $A\beta_{42}$ es más abundante que el $A\beta_{40}$ debido a su mayor velocidad de fibrilación e insolubilidad. El depósito de amiloide no siempre sigue un patrón de progresión estereotipado, sino que, en términos generales, se desarrolla en el isocórtex y sólo más tarde afecta a las estructuras subcorticales. Las placas amiloides afectan en menor medida a la corteza entorrinal y a las formaciones del hipocampo [2].

2. **Conglomerados de fibras intracelulares** compuestos de proteína Tau hiperfosforilada (ovillos neurofibrilares) que se acumulan dentro de las células. La hiperfosforilación de la proteína Tau disminuye la afinidad por los microtúbulos y promueve su autosegregación, formándose filamentos anormales que pueden retorcerse unos alrededor de otros para formar filamentos helicoidales pareados

(PHF) y acumularse en el citoplasma neuronal, en los axones y dendritas. La formación de PHF provoca una pérdida de microtúbulos citoesqueléticos y proteínas asociadas a la tubulina. La patología de Tau suele comenzar en el allocórtex del lóbulo temporal medio (córtex entorrinal e hipocampo) antes de extenderse al isocórtex asociativo [3].

Además, la neuroinflamación constituye uno de los principales procesos que contribuye a que la enfermedad progrese. Esta respuesta está mediada por las células de la inmunidad innata del sistema nervioso central (SNC), la microglía y los astrocitos, así como por células endoteliales y células sanguíneas infiltrantes. En respuesta a un daño del SNC, éstas ejercen un papel neuroprotector, liberando citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-18, factor de necrosis tumoral (TNF)) y quimiocinas que provocan un estrés oxidativo progresivo, con el aumento de prostaglandinas, óxido nítrico (NO) y otras especies reactivas de oxígeno. La presencia del estímulo desencadenante cronifica a un estado inflamatorio neurotóxico caracterizado por diversos procesos: alteración de la homeóstasis del calcio con hiperactivación de las proteínas cinasas e inactivación de fosfatasas, favoreciendo la hiperfosforilación de Tau; elevación del glutamato extrasináptico, con la consiguiente excitotoxicidad mediada por el receptor de ácido N-metil-D-aspartico extrasináptico (NMDAR); déficit de neurotransmisores y muerte neuronal por apoptosis [4].

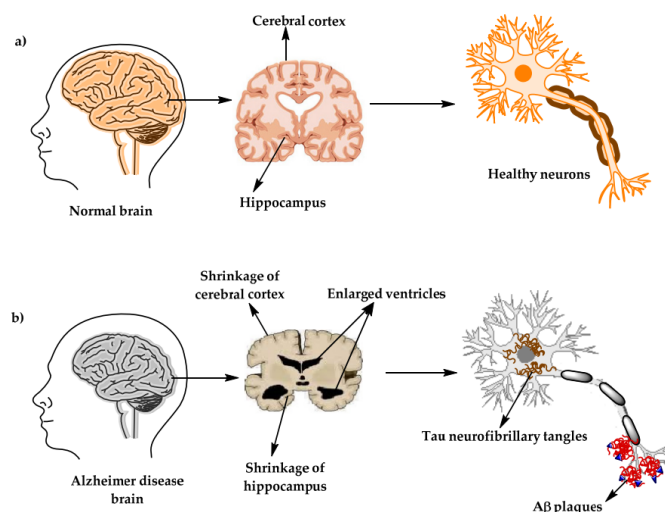


Figura 1. La estructura fisiológica del cerebro y las neuronas en a) cerebro sano, b) cerebro con EA [5].

Tener un conocimiento de la contribución de cada uno de estos mecanismos patológicos en el desarrollo y la progresión de la EA es fundamental para poder abordar el tratamiento de la EA. Es por todo ello que uno de los objetivos ha sido establecer cuál de los mecanismos se asienta en la etiopatogenia, razón por la cual se establecen diferentes hipótesis como determinantes de la casualidad que subyace a la enfermedad: “hipótesis de la cascada amiloide”, “hipótesis de la hiperfosforilación de Tau”, “hipótesis colinérgica”, hipótesis de la neuroinflamación, y más recientemente, teorías basadas en la “hipótesis de la cascada mitocondrial” o la “hipótesis neurovascular” [6].

La “hipótesis de la cascada amiloide” o “hipótesis amiloidogénica” ha sido la más aceptada en los últimos 28 años. Esta hipótesis defiende el depósito de las placas amiloides como

desencadenante de la enfermedad, lo que conlleva a la progresión de la hiperfosforilación de Tau, disfunción sináptica, inflamación, pérdida neuronal y neurotoxicidad [7].

1.1.1 Epidemiología

La EA ha sido declarada "prioridad de salud pública mundial" por la OMS, ya que no existe un tratamiento efectivo que revierta la enfermedad. Actualmente, la EA es la principal causa de demencia en personas mayores de 60 años. Alrededor del 50-80% de las personas con demencia padecen Alzheimer. Más de 40 millones de personas padecen la enfermedad a nivel mundial y se estima que aumente a más de 100 millones de personas en 2050.

Según los datos estadísticos recogidos en todo el mundo, las mujeres son más propensas a padecer EA que los hombres, y el riesgo aumenta aún más con la edad (7,1 % en mujeres frente a 3,3 % en hombres) [8,9].

1.1.2 Factores de riesgo genético

Existen factores de riesgo genético vinculados a la EA, entre las que destacan mutaciones raras hereditarias y variaciones genéticas más comunes. A estas mutaciones se les atribuye el riesgo a presentar la enfermedad a una edad más temprana, permitiendo identificarlas en sus dos formas: la EA familiar o de inicio temprano y la EA esporádica o de inicio tardío.

Respecto a la EA familiar, está vinculada a mutaciones que radican principalmente en herencia autosómica dominante en el gen APP y otros genes de la vía amiloidogénica como el presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2), los cuales son dominios catalíticos de la γ -secretasa (Figura 2). Los individuos afectados por la forma hereditaria de la enfermedad de Alzheimer constituyen menos del 5 % de los casos identificados y experimentan los signos distintivos de la enfermedad antes de cumplir los 65 años, pudiendo manifestarse entre los 30 y 50 años de edad [10,11].

La EA de tipo esporádico, que es la forma más común, afecta a una gran variedad de genes, habiéndose identificado más de 40 *loci* de riesgo genético [12]. Destaca por la vinculación más notoria con la EA los alelos del gen de la apolipoproteína E (APOE ϵ 2, ϵ 3 o ϵ 4), que es un transportador de lípidos que regula el metabolismo del colesterol. Aquellos individuos que sean portadores heterocigotos de APOE ϵ 4 presentan un riesgo de padecer la enfermedad de entre 3 a 4 veces superior en comparación con aquellos individuos portadores del APOE ϵ 3, incrementándose hasta 12-15 veces si son homocigotos [13].

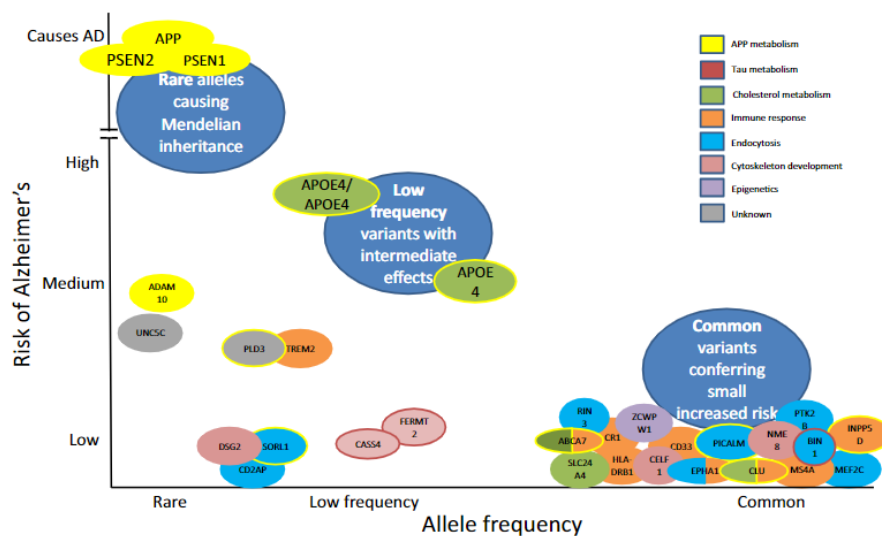


Figura 2. Resumen de los genes implicados hasta la fecha en la EA. Cuando hay dos colores internos, el gen está implicado en más de una vía. Los genes marcados con un círculo amarillo también influyen en el metabolismo de la proteína precursora del amiloide; los marcados con un círculo rojo influyen en el metabolismo de la proteína Tau [14].

1.1.3 Factores de riesgo modificables

No solo existe un riesgo exclusivamente genético para padecer la enfermedad, puesto que se ha evidenciado que existe una relación directa entre estilos o hábitos de vida y la EA. Los factores de riesgo modificables en la edad avanzada son los hábitos de vida como el tabaco, la baja actividad física, la soledad, el consumo excesivo de alcohol, o incluso enfermedades como la depresión.

A pesar de la complejidad de la EA y el desconocimiento de la etiología de las formas esporádicas, se ha demostrado una asociación directa entre determinados estilos o hábitos de vida y la EA. El tabaquismo, la depresión, la baja actividad física, el aislamiento social o el abuso de alcohol son los principales factores de riesgo modificables en la edad avanzada. De igual manera, se ha confirmado que el tratamiento de afecciones simultáneas, como la diabetes o la angiopatía amiloide cerebral, puede desacelerar el avance de la enfermedad. Por lo tanto, la prevención y manejo temprano de factores de riesgo vascular y metabólico, como la diabetes mellitus tipo II, la presión arterial elevada, el alto nivel de colesterol en sangre y la obstrucción de las arterias, pueden disminuir el peligro de padecer demencia [15].

1.1.4 Tratamiento farmacológico

En la actualidad no existe un tratamiento que revierta la neurodegeneración. Hasta la fecha, los fármacos aprobados se limitan al tratamiento sintomático, mejoran la disfunción cognitiva o el control de los síntomas neuropsiquiátricos sin afectar a las causas biológicas que atañe la EA. De los pocos fármacos que existen, cuatro son inhibidores de la colinesterasa: Tacrina, Donepezilo, Galantamina y Rivastigmina; y un antagonista del receptor N-metil-D-aspartato: Memantina. Las indicaciones para estos fármacos son en combinación o de manera individual para tratar la demencia leve o moderada asociada a la

EA. No obstante, su eficacia clínica es limitada, producen un retraso en la progresión de la enfermedad durante un periodo de tiempo corto.

Debido a las pocas opciones terapéuticas, actualmente los esfuerzos farmacoterapéuticos destinados a la EA se han limitado al desarrollo de terapias modificadoras de la enfermedad (TME). Teniendo en cuenta la hipótesis amiloidogénica como el eje central de la fisiopatología de la EA, los intereses se han focalizado en el desarrollo de fármacos dirigidos a la regulación de la homeóstasis de los péptidos A β , inhibiendo su producción u oligomerización, o favoreciendo su eliminación [16]. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de estos fármacos no son demasiado prometedores. En su mayoría no han demostrado una mejora sustancial de los signos cognitivos, observándose en ocasiones un efecto contraproducente, en el cual se agrava el deterioro cognitivo y, además, viene acompañado de reacciones adversas [17,18].

1.1.5 Nuevas estrategias terapéuticas

Existen diferentes indicadores clínicos que han planteado cierta polémica para mantener la hipótesis amiloidogénica [19]. Destacan como cuestiones no resueltas de la hipótesis amiloidogénica el depósito de A β en personas sanas o la escasa asociación entre las placas A β y los síntomas clínicos graves, que, si se suma a los pocos resultados exitosos de las terapias anti-A β , hacen replantearse su reformulación [20]. Esto supone un nuevo reto que obliga a buscar nuevas estrategias que permitan expandir la búsqueda de dianas terapéuticas efectivas.

Considerando que la EA es una enfermedad compleja, pleiotrópica y en la mayoría de los casos poligénica, los profesionales con un gran *expertise* en la enfermedad sugieren el desarrollo de nuevas terapias basadas en los endofenotipos o mecanismos patológicos únicos subyacentes a la enfermedad, más que centrarse en una única hipótesis [21]. En el conjunto de mecanismos patológicos se incluyen las comorbilidades, factores de riesgo modificables con mecanismo biológico propio que contribuyen tanto a la predisposición de la enfermedad como a su progresión.

En la actualidad están siendo evaluados 143 fármacos en 172 ensayos clínicos. La mayoría de estos fármacos son modificadores de la enfermedad (119, 83.2%) con mecanismos de acción (MOA por sus siglas en inglés, Mechanism Of Action) asociados a la EA muy distintos. La mayoría de los fármacos evaluados tienen acción antiinflamatoria e inmunomoduladora (19.3%), les siguen fármacos para el tratamiento de la amiloidosis (16,8%), plasticidad sináptica y neuroprotección (16%), o tautopatía (10.9%) [22].

1.2. Reposicionamiento o reutilización de fármacos

Para desarrollar una nueva entidad molecular (NEM) como fármaco, la duración oscila entre 10-15 años, con un coste que se encuentra entre los 500 y los 2 mil millones de dólares. Esto supone una inversión económica elevada para las farmacéuticas, la cual, no se traduce en el número de medicamentos aprobados por las agencias reguladoras. De los 5000-10000 compuestos iniciales que comprenden las grandes librerías, tan sólo una o ninguna llegará a la fase de comercialización. La baja eficiencia del proceso es debida principalmente al fallo terapéutico durante los ensayos clínicos, por un perfil de seguridad

bajo o por una falta de eficacia en la enfermedad para la cual se desarrolló. Actualmente, la tasa de fallo terapéutico (TFT) en los ensayos clínicos se determina que está sobre un 90% para cualquier enfermedad [23], pudiendo registrar porcentajes más elevados para fármacos con un MOA desconocido, así como en enfermedades muy complejas como es la EA [24].

Estos valores, que se traducen en una dificultad elevada para desarrollar nuevos fármacos, no solo implica un retraso en la disposición de soluciones para los pacientes, sino que produce un efecto desincentivador en la industria farmacéutica. Por ello, una de las principales estrategias que está ganando peso en los últimos años ha sido el reposicionamiento o reutilización de fármacos (RF). El RF hace referencia a la utilización de fármacos para un fin distinto al que fue destinado originalmente. Es decir, identificación de nuevos usos o indicaciones terapéuticas para fármacos existentes.

La importancia de la estrategia de reposicionamiento de los fármacos ha aumentado dentro de la industria farmacéutica ya que podría disminuir los costos de desarrollo de los fármacos, acortar el tiempo invertido en el proceso y mejoraría las posibilidades de éxito [25], debido a varias ventajas:

- Se conoce la respuesta biológica que los medicamentos ejercen en humanos, ya que los ensayos clínicos los pasaron satisfactoriamente.
- Se conoce que dichas moléculas son bioactivas, seguras, biodisponibles y se ha obtenido la autorización de las agencias reguladoras para su uso en humanos. Además, es sabido que algunos fármacos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, característica importante en el caso de un medicamento para la EA.
- En algunos, ya se han llevado a cabo los estudios ADME tox que se deben realizar para una nueva estructura molecular.

Aplicando las diferentes plataformas tecnológicas existentes, el reposicionamiento de fármacos puede encontrar nuevas indicaciones para medicamentos y compuestos que se engloban dentro de las siguientes categorías [26]:

- **Medicamentos que se encuentran aún en fase de desarrollo clínico.** Se ha validado que estos fármacos tienen MOA que pueden ser de gran importancia para más de una patología, y, además, han superado los ensayos clínicos de fase 1 lo que supone que tienen perfiles de seguridad aceptables. Además, están siendo evaluados mediante ensayos clínicos de fase 2 para verificar las aplicaciones terapéuticas definidas.
- **Medicamentos que no superaron satisfactoriamente las últimas etapas de desarrollo de medicamentos (fase 2 y fase 3)** por pocas evidencias de su eficacia, pero no se les cuestiona su seguridad.
- **Medicamentos que se abandonaron** durante su proceso de desarrollo por razones comerciales.
- **Medicamentos comercializados** cuyas patentes han expirado o están a punto de expirar.

- **Compuestos en investigación (básica o preclínica) que fueron sintetizados para un fin inicial o área terapéutica específica** y que en el proceso de desarrollo se encuentren otras propiedades que puedan ser útiles para otra índole terapéutica.

La nueva utilización de los medicamentos existentes para otros usos se descubrió de manera imprevista. El éxito del reposicionamiento de fármacos ha contribuido enormemente al interés de seguir ahondando en la expansión de las indicaciones terapéuticas de fármacos ya conocidos. Por ejemplo, el sildenafil se investigó originalmente para el tratamiento de la hipertensión arterial y angina de pecho, pero se transformó en un éxito de ventas por su aplicación en el tratamiento de la disfunción eréctil [27]. La aspirina es otro fármaco que ha ampliado sus usos terapéuticos y actualmente se utiliza en la prevención de accidentes cerebro y cardiovasculares en pacientes con una condición cardiovascular preexistente [28]. La Talidomida, medicamento utilizado al inicio como sedante y antiemético, fue retirado del mercado por producir miles de casos de malformaciones congénitas en mujeres embarazadas. No obstante, en la actualidad su indicación terapéutica es distinta ya que se prescribe como segunda línea terapéutica para el tratamiento del eritema nudoso leproso y el mieloma múltiple. Otro ejemplo sería el de la Zidovudina, un fármaco que en un principio se desarrolló como anticancerígeno y que se convirtió más tarde en el primer fármaco utilizado para la terapia antirretroviral frente al VIH capaz de cronificar la enfermedad [29, 30].

El éxito de los anteriores casos mencionados demuestra que el RF es una poderosa alternativa para evadir el largo proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos [31]. Descubrir un nuevo uso para un medicamento que ha completado todas las etapas de evaluación sugiere, en el mejor de los casos, que su eficacia para la nueva aplicación pueda ser evaluada directamente en ensayos clínicos de fase II. Este fármaco cuenta con un historial de seguridad, características farmacocinéticas y farmacodinámicas conocidas, y su producción a gran escala ha sido optimizada. Esto conlleva a una reducción en los costos y el tiempo de desarrollo, una disminución de la posibilidad de fracaso en el tratamiento y, por consiguiente, un retorno de la inversión con menos riesgos, además de una mayor accesibilidad a los tratamientos (figura 3).

Estas observaciones son especialmente significativas en el caso de enfermedades en las que la inversión en la creación de nuevos medicamentos es limitada o inexistente, tal como sucede en las enfermedades huérfanas o desatendidas, así como en enfermedades para las cuales la disponibilidad de fármacos eficaces es escasa debido a su complejidad, como es el caso de las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA, que es la que nos atañe en este proyecto.

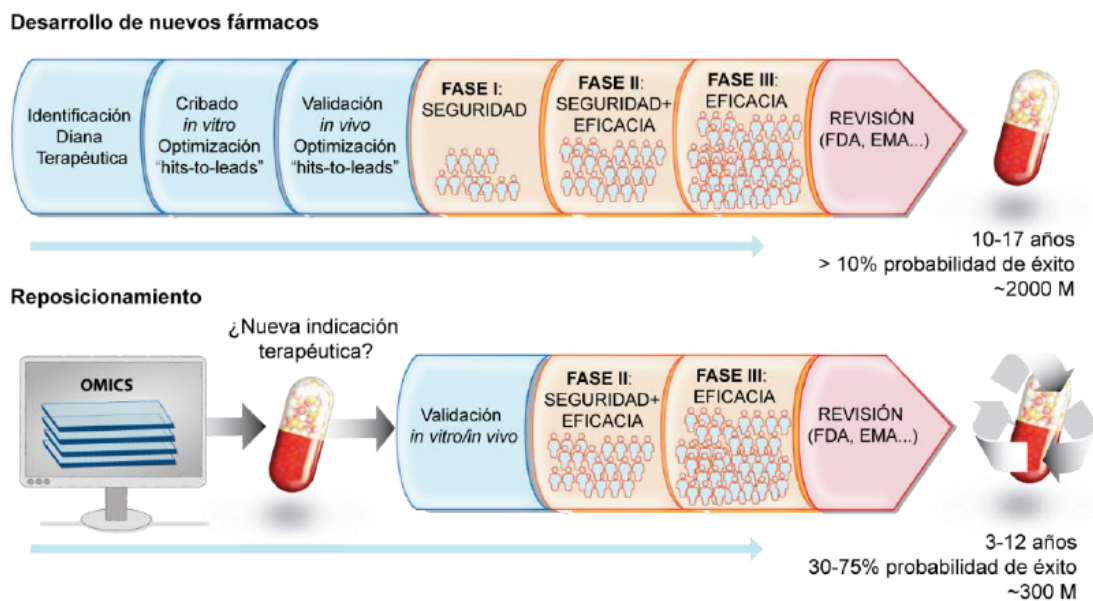


Figura 3. Proceso de desarrollo y evaluación de fármacos de novo versus reposicionamiento.

1.2.1. Principios de reposicionamiento de fármacos

La bibliografía clasifica dos tipos principales de reposicionamiento de fármacos apoyados por dos principios científicos [32]:

- **Compuesto conocido-nueva diana.** Esto se basa en que los fármacos interactúan con múltiples dianas o vías. Estas interacciones con “efectos inespecíficos” pueden ser las que ocasionan los efectos secundarios de un fármaco. No obstante, en ciertos casos, esta interacción con otra diana (no la principal por la que se estudió) podría desencadenar un efecto deseado para el tratamiento de otra patología.

Un ejemplo sería que el medicamento antiinflamatorio no esteroideo ibuprofeno, podría tener una acción neuroprotectora frente al Parkinson debido al componente neuroinflamatorio de la enfermedad, y a la vez por unirse a receptores proliferativos y activadores de peroxisomas, una diana terapéutica en el estudio del Parkinson, que inhibe la apoptosis y el daño oxidativo [33,34].

- **Mecanismo conocido-nueva indicación.** Este principio indica que una diana biológica puede ser relevante para más de una enfermedad, vía o proceso. En este caso, la reutilización del medicamento se lleva a cabo mediante la búsqueda de una relación entre la diana conocida y la nueva enfermedad.

Un ejemplo sería la duloxetina, el cual fue autorizado por la FDA en 2004 como tratamiento antidepresivo. Durante el desarrollo de este medicamento se sugirió que su MOA, que consiste en el bloqueo de la recaptación de serotonina y noradrenalina, podría ser adecuado para tratar la incontinencia urinaria. Esto se debe a que se sabe que ambos neurotransmisores tienen efecto sobre el esfínter uretral, evitando las pérdidas de orina [35].

A continuación, en la tabla 1 se ejemplifica el reposicionamiento para determinados fármacos comerciales:

Tabla 1. Ejemplos de fármacos reposicionados. Se muestra el nombre genérico del fármaco, la indicación original, la nueva indicación y la referencia bibliográfica. Tabla adaptada de (Bellera et al. [36]).

Fármaco	Indicación original	Nueva indicación	Referencia
Amantadina	Antiinfluenza	Enfermedad de Parkinson	<i>Hubsher et al., 2012</i> <i>Pahwa et al., 2017</i>
Aspirina	Dolor, fiebre e inflamación	Antiplaquetario, enfermedad arteria coronaria	<i>Patrono et al., 2005</i>
Anfotericina B	Infecciones fúngicas	Leishmaniasis	<i>Bern et al., 2006</i>
Bromocriptina	Enfermedad de Párkinson, hiperprolactemia y galactorrea	Diabetes mellitus	<i>Holt et al., 2010</i>
Burpropion	Depresión	Terapia para dejar de fumar	<i>Lerman et al., 2004</i>
Celecoxib	Osteoartritis y artritis reumatoide en adultos	Poliposis adenomatosa familiar, cáncer de colon y de mama	<i>Jendrossek, 2013; Kim et al., 2010; Steinbach et al., 2000</i>
Duloxetina	Depresión	Incontinencia urinaria	<i>Sweeney et al., 2005</i>
Finasterida	Hiperplasia prostática	Pérdida de cabello	<i>Leyden et al., 1999; Rossi et al., 2011</i>
Fluoxetina	Depresión	Disforia premenstrual	<i>Pearlstein et al., 1997; Steiner et al., 1995</i>
Galantamina	Parálisis muscular	Enfermedad de Alzheimer	<i>Lilienfeld, 2002; Richarz et al., 2014</i>
Gemcitabina	Infecciones virales	Cáncer	<i>King, 1996</i>
Metotrexato	Cáncer	Artritis reumatoide	<i>Burmester et al., 2014; Emery et al., 2006</i>
Minoxidil	Hipertensión	Pérdida de cabello	<i>Melkote et al., 2009; Olsen et al., 2002</i>
Paclitaxel	Cáncer	Prevención de reestenosis coronaria	<i>Byrne et al., 2013; Gershlick et al., 2004</i>
Raloxifeno	Cáncer de próstata	Osteoporosis	<i>Cranney et al., 2005; Das et al., 2013</i>
Ropinirol	Hipertensión	Enfermedad de Parkinson	<i>Schrag et al., 2002; Sethi et al., 1998; Stocchi et al., 2014</i>
Sildenafil	Angina de pecho	Disfunción eréctil	<i>Ghofrani et al., 2006</i>
Tadalafilo	Inflamación y enfermedad cardiovascular	Disfunción eréctil	<i>Ali, 2008</i>
Talidomida	Hiperémesis gravídica	Mieloma múltiple	<i>Lindner et al., 2016</i>
Topiramato	Epilepsia	Obesidad	<i>Appolinario et al., 2002; McElroy et al., 2003</i>
Warfarina	Prevención de Trombosis	Profilaxis secundaria de infarto al miocardio	<i>Hurlen et al., 2002; Hurlen et al., 1994</i>
Zidovudina	Cáncer	VIH/sida	<i>Broder, 2010</i>

1.2.2. Aproximaciones computacionales

La amplia disponibilidad de datos sobre la estructura de proteínas, farmacóforos, grandes conjuntos de datos ómicos y registros clínicos electrónicos ha propiciado el surgimiento y la aplicación de diversas metodologías computacionales para realizar un análisis efectivo de RF. Estas pueden ser categorizadas según la fuente de información empleada, o en base a las metodologías o algoritmos utilizados (como métodos basados en similitud, redes o aprendizaje automático), ya sea de manera individual o en conjunto, con el propósito de analizar de manera sistemática diversos tipos de datos a gran escala [37-39].

El propósito de estas estrategias es proponer nuevas hipótesis de reutilización de fármacos para una indicación específica, al mismo tiempo que se disminuye la cantidad de moléculas candidatas que deben ser examinadas en entornos de laboratorio, ya sea *in vitro* o *in vivo* [37].

El análisis computacional *in silico* facilita el estudio simultáneo de un gran número de fármacos y enfermedades, acelerando considerablemente el proceso de reutilización con un costo menor en comparación con los exhaustivos cribados fenotípicos de alto rendimiento. Y, aunque estas aproximaciones han sido ampliamente empleadas en la última década, con la pandemia ocasionada por la enfermedad COVID-19, ha manifestado su importancia, trascendencia, efectividad y necesidad en el proceso de RF, reconocida por los organismos públicos y gran parte de la comunidad científica [40, 41].

1.2.2.1. Reposicionamiento basado en el transcriptoma: el paradigma de la reversión

Una de las metodologías más empleadas en el RF *in silico* es aquella basada en la similitud o coincidencia de firmas entre perfiles transcriptómicos. El fundamento de esta estrategia se basa en los estudios de Hughes *et al.*, los cuales demostraron la inferencia funcional de variantes genéticas de *Saccharomyces Cerevisiae* a partir de un compendio de perfiles de expresión génica de referencia, derivada de mutantes por delección y tratamientos farmacológicos [42]. Posteriormente, Lamb *et al.* extendieron esta aproximación a líneas celulares humanas tratadas con fármacos, sentando las bases del denominado “principio de reversión de los perfiles de expresión” (SRP por sus siglas en inglés, *Signature Reversion Principle*) [43].

Este principio establece que, si existe una relación positiva entre los perfiles transcriptómicos de la enfermedad y el fármaco, una vez que las bases moleculares del fármaco están definidas, estas podrían ser extrapoladas como vías de activación de la enfermedad. Alternativamente, el fármaco podría ser considerado como un posible inductor de la enfermedad para el desarrollo de modelos *in vitro* e *in vivo*. Por otro lado, si los cambios en la expresión génica provocados por el fármaco son opuestos a los de la enfermedad, se supone que el fármaco podría revertir potencialmente la firma de la enfermedad hacia el fenotipo normal, es decir, podría ser un fármaco adecuado para su uso en el tratamiento.

La posterior clasificación de los fármacos según la fuerza y la dirección de la correlación, determinada a partir de varios puntajes de conectividad [44, 45], ayuda a crear una lista priorizada de fármacos. Aquellos con los puntajes de conectividad negativos más altos

(perfil transcriptómico inverso) son considerados como posibles candidatos para el tratamiento de la enfermedad en cuestión (figura 4).

Esta táctica posibilita la creación de conexiones funcionales basadas en los niveles de expresión génica tanto entre enfermedades y fármacos, como entre distintas enfermedades o diferentes fármacos. Esto, a su vez, facilita inferir el mecanismo de acción o las dianas terapéuticas [46]. Este es uno de los beneficios clave de este enfoque, dado que a diferencia de otros métodos computacionales, no requiere un conocimiento previo de posibles dianas terapéuticas. Se clasifica como una aproximación "off-target" ya que indirectamente examina todas las posibilidades, fomentando el concepto de polifarmacología, es decir, la búsqueda de fármacos que actúen en múltiples dianas terapéuticas ya sea en una o en múltiples vías de la patogenia de la enfermedad [47].

Este enfoque de reposicionamiento *in silico* ha sido confirmado en varias enfermedades, evidenciando la eficacia de los fármacos sugeridos en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. En su mayoría ha sido aplicado para el RF en distintos tipos de cáncer [48-50], pero también en la enfermedad de Gaucher [51], nefropatía diabética [52], la COVID-19 [53], y en los últimos años en la EA [54, 55].

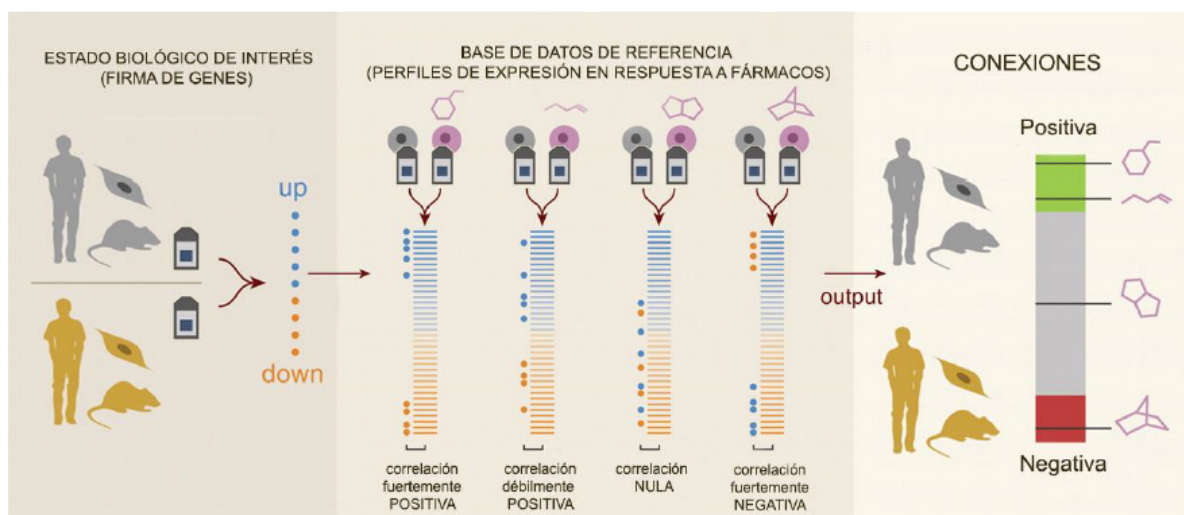


Figura 4. Principio de reversión del transcriptoma en el RF. Adaptada de Lamb y col.

1.3. Medicina personalizada y de precisión en la enfermedad de Alzheimer: El sexo como factor esencial

Existen indicadores epidemiológicos y clínicos que demuestran un evidente dimorfismo sexual en la EA, siendo ésta especialmente acentuada en las mujeres. La evidencia científica es concluyente en el impacto del sexo en la predisposición a la enfermedad, además de la manifestación de los signos y síntomas cognitivos y psiquiátricos, e incluso, en el riesgo asociado a determinantes genéticos y determinados estilos de vida o comorbilidades (tabla 2) [56, 57].

Tabla 2. Diferencias de sexo en pacientes con EA basada en indicadores epidemiológicos y clínicos. LCF: Líquido Cefalorraquídeo; TEP: Tomografía por Emisión de Positrones; DCL: Deterioro Cognitivo Leve.

INDICADORES	
Clínicos	Epidemiológicos
<p>Diagnóstico</p> <ul style="list-style-type: none"> El DCL es más frecuente en hombres. En las mujeres suele diagnosticarse en etapas más avanzadas Los niveles de determinados biomarcadores detectados en el LCF difieren entre hombres y mujeres. Imágenes por TEP han demostrado que los niveles de Tau se acumulan más rápido y en mayor cantidad en mujeres 	<p>Prevalencia</p> <ul style="list-style-type: none"> Dos tercios de los pacientes con EA son mujeres
<p>Progresión</p> <ul style="list-style-type: none"> Entre los pacientes diagnosticados con DCL, la enfermedad progresa mucho más rápido en mujeres 	<p>Factores de riesgo</p> <ul style="list-style-type: none"> Mujeres portadoras de las isoformas APO^ε3/4 presentan un mayor riesgo de deterioro cognitivo que los hombres portadores Factores de riesgo modificables específicos de sexo: diabetes, hipertensión, obesidad, depresión, consumo excesivo de alcohol, consumo de tabaco, lesión cerebral traumática y nivel sociocultural
<p>Pronóstico</p> <ul style="list-style-type: none"> Entre los pacientes diagnosticados con DCL, las mujeres tienen una probabilidad significativamente mayor de desarrollar demencia 	
<p>Signos y Síntomas</p> <ul style="list-style-type: none"> Las tasas y los patrones de atrofia cerebral difieren a lo largo del continuo de la EA entre los sexos En general las manifestaciones clínicas son más exacerbadas en mujeres, aunque también se han descrito algunas de mayor afectación en hombres, como la memoria verbal 	

Recientemente, tanto la comunidad científica como diversas organizaciones gubernamentales han puesto en marcha planes estratégicos para avanzar hacia una Medicina Personalizada y de Precisión (MPP). Se define como aquella que surge de la fusión de datos genómicos y otras disciplinas "ómicas" con la información clínica del paciente y su entorno [58]. El objetivo de la MPP es mejorar la estratificación del riesgo y ayudar a la toma de decisiones en los tratamientos. Dentro de este marco, se promueve la integración de la perspectiva del sexo como una estrategia vital para comprender su influencia en las disparidades de salud y enfermedad entre personas, con un enfoque particular en el abordaje de trastornos psiquiátricos y neurodegenerativos [59]. En este sentido, varios estudios multiómicos han revelado las disparidades de sexo en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer a nivel molecular. Entre estos, los estudios transcriptómicos son prominentes, ya que han permitido identificar firmas inmunes y metabólicas distintivas según el sexo [60].

Si las disparidades en relación al sexo en la EA son tan evidentes en términos epidemiológicos, clínicos y moleculares, sería lógico que la respuesta a los tratamientos

farmacológicos (RTF) reflejara dicha discrepancia. En términos generales y para cualquier enfermedad, la RTF se atribuye a factores de diversa índole, como genéticos, epigenéticos, hormonales, inmunológicos, metabólicos y ambientales [61]. Principalmente, se detallan las reacciones adversas y perfiles farmacocinéticos específicos de cada sexo, y en menor medida, diferencias en la eficacia. Sin embargo, a diferencia de otras enfermedades donde no existe un dimorfismo sexual tan claro, la respuesta a los tratamientos específica para cada sexo en pacientes con EA no ha sido ampliamente investigada. La mayoría de los ensayos clínicos no describen métodos apropiados para evaluar la respuesta a los tratamientos según el sexo, o no proporcionan un análisis detallado de los resultados por sexo. [62].

La creciente evidencia revela que el sexo es un factor crucial en la diversidad de la EA, y posiblemente juega un papel crucial en la clasificación de los pacientes en las estrategias de prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Teniendo en cuenta que el RF es una de las estrategias más prometedoras en la búsqueda de terapias para la EA, la consideración de la perspectiva de la variable sexo podría añadir un valor significativo. Esto podría conducir a tratamientos más personalizados, directamente aplicables en ensayos clínicos, asegurando el acceso a fármacos de una elevada calidad, eficacia y seguridad, así como un repartimiento igualitario de las ventajas que supone innovar entre hombres y mujeres [63].

2. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto es identificar nuevos posibles fármacos para el tratamiento de la EA, mediante el uso del reposicionamiento o reutilización *in silico* de fármacos, con la variable sexo como determinante para las nuevas estrategias propuestas. Se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- O1: Identificar potenciales fármacos con capacidad de reversión específica por sexo y región cerebral.
- O2: Analizar conjuntamente los mecanismos de acción de los fármacos identificados por sexo a partir del análisis del enriquecimiento funcional de sus genes dianas.
- O3: Observar la diferencia de utilizar diferentes algoritmos para el enriquecimiento funcional.
- O4: Determinar si existen diferencias por la variable sexo para el desarrollo de fármacos.
- O5: Analizar si el RF *in silico* basado en el transcriptoma es una estrategia prometedora en la búsqueda de fármacos.

3. Materiales y Métodos

Para la consecución del objetivo principal de este trabajo y para poder realizar el proyecto, se siguieron diferentes metodologías y se usó un paquete desarrollado para R para llevarlo a cabo. En esta sección se describe detalladamente cada recurso utilizado, así como los datos utilizados en el proyecto, de donde proceden y cómo se trataron previamente y cómo se usaron a lo largo del trabajo.

3.1. SignatureSearch

SignatureSearch [64] es un paquete que implementa algoritmos y estructuras de datos para realizar búsquedas de firmas de expresión génica (*Gene Expression Signature*, GES) e interpretar funcionalmente los resultados con métodos especializados de enriquecimiento. Estas utilidades permiten estudiar los efectos de las perturbaciones genéticas, químicas y ambientales en los sistemas biológicos. En concreto, en el descubrimiento de fármacos pueden utilizarse para identificar, de acuerdo al principio de reversión, fármacos capaces de revertir el fenotipo de la enfermedad, o asociar nuevos MoA a compuestos bioactivos [65,66].

El flujo de trabajo seguido en este trabajo se divide en dos pasos principales, como se muestra en la figura 5. En primer lugar, hemos utilizado diferentes métodos de búsqueda de perfiles transcriptómicos (GES Search, GESS) para identificar perturbadores, que en el caso que nos concierne son fármacos que inducen firmas de expresión génica con una correlación inversa a perfiles transcriptómicos de pacientes con EA. El resultado muestra una lista de fármacos ordenados según la métrica de similitud del método GESS correspondiente [64].

En segundo lugar, dado que se conocen las dianas terapéuticas y MoA de la mayoría de los fármacos en las bases de datos de referencia, aplicamos métodos especializados de análisis de enriquecimiento funcional (*Functional Enrichment Analysis*, FEA) a partir de diferentes sistemas de anotaciones, como Gene Ontology (GO), pathways o Disease Ontologies (DO). Como se comentará más adelante, en el trabajo se ha utilizado GO, KEGG y Reactome. Las asociaciones resultantes son útiles para comprender mejor los mecanismos farmacológicos y/o patológicos, y para desarrollar nuevos enfoques de reutilización de fármacos [64].

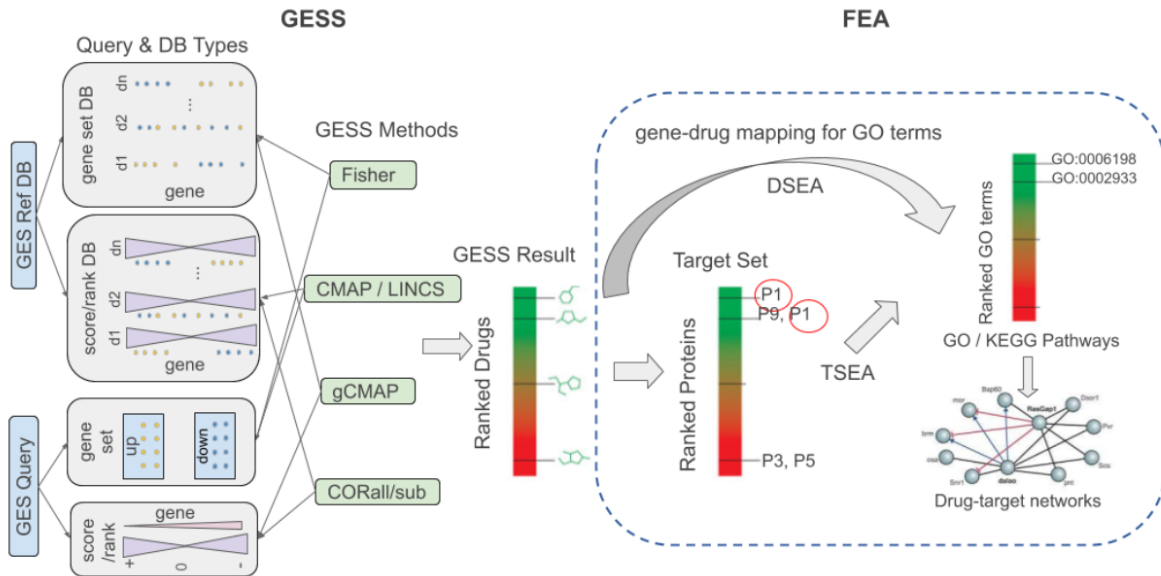


Figura 5. Flujo de trabajo de signatureSearch. Se indican los métodos GESS y de enriquecimiento implementados en el mismo paquete.

La Figura 5 ilustra el diseño del paquete, sus contenedores de datos y métodos utilizados por los pasos individuales del flujo de trabajo de búsqueda de firmas. Como se ilustra, los perfiles de expresión génica de todo el genoma obtenidos a partir de diferentes tecnologías (por ejemplo, RNA-Seq o microarrays), se utilizan para construir una base de datos de referencia almacenada como archivo *HDF5* [64].

La búsqueda con una firma de consulta contra una base de datos de referencia se inicia declarando todos los parámetros en un objeto de búsqueda *qSig*. Se tiene la opción de elegir uno de los cinco algoritmos de búsqueda diferentes implementados por signatureSearch. La naturaleza de la firma de consulta junto con el método de búsqueda elegido, define el tipo de datos de expresión utilizados para la búsqueda. Para minimizar los requisitos de memoria y mejorar el rendimiento temporal, lo que implementa el paquete de trabajo signatureSearch es que las grandes bases de datos de referencia se busquen en lotes con tamaños definibles por el usuario. Los resultados de la búsqueda se almacenan en un objeto *gessResult*. Este último contiene toda la información necesaria para ser procesada por los métodos de análisis de enriquecimiento funcional (FEA) posteriores, siendo en este caso los métodos de análisis de enriquecimiento de conjuntos de fármacos y conjuntos de dianas (TSEA y DSEA) (Figura 6) [64].

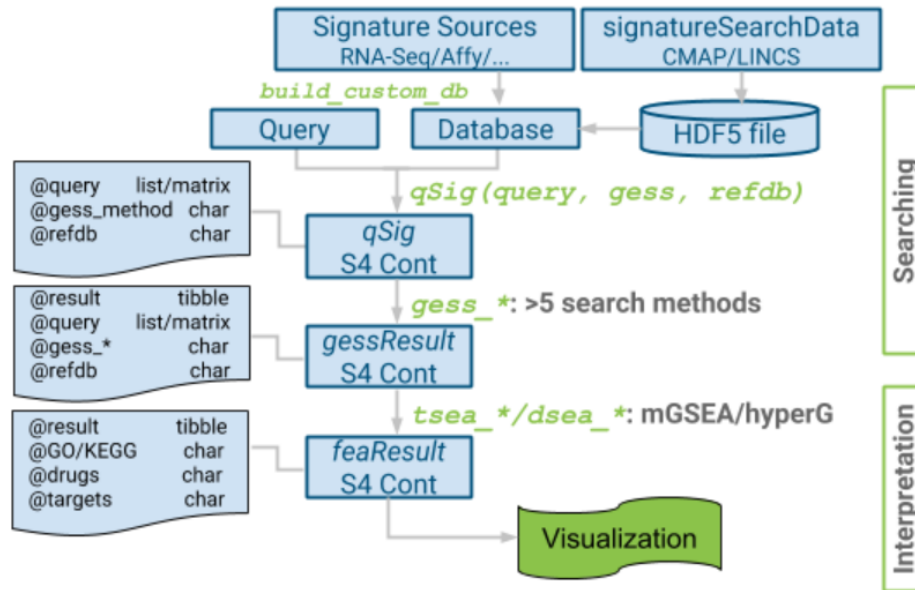


Figura 6. Diseño del paquete con respecto a sus contenedores de datos y métodos utilizados por los pasos individuales del flujo de trabajo de búsqueda de firmas.

Los resultados de enriquecimiento funcional obtenidos se almacenan como un objeto `feaResult` que puede pasarse a varios métodos de construcción y visualización de redes fármaco-objetivo.

3.1.1. Bases de datos de referencia

El paquete de ayuda `signatureSearchData` proporciona acceso a bases de datos GES pre-construidas, incluyendo CMAP2, LINCS y LINCS2, que se almacenan en ExperimentHub de Bioconductor como archivos HDF5 [43,67].

Las bases de datos de referencia almacenan la siguiente información:

- **lincs** contiene puntuaciones z moderadas del análisis de expresión diferencial (ED) de 12.328 genes de 8.140 tratamientos de 30 líneas celulares que corresponden a un total de 45.956 firmas.
- **lincs_expr** contiene valores de intensidad de expresión génica de 5.925 tratamientos en 30 líneas celulares que corresponden a un total de 38.824 firmas.
- **cmmap** contiene logFC de 12.437 genes de 1.281 tratamientos en 5 líneas celulares que se corresponden con un total de 3.478 firmas.
- **cmmap_expr** contiene valores medios de expresión de 1.309 tratamientos farmacológicos en 4 líneas celulares correspondientes a un total de 3.587 firmas. Para minimizar la redundancia en las bases de datos `lincs` y `lincs_expr`, se ensamblaron a partir de GES correspondientes a una dosis de compuesto y un tiempo de tratamiento de 10µM y 24h, respectivamente.
- **lincs2** contiene puntuaciones z moderadas a partir del análisis DE de 12.328 genes de 30.456 tratamientos de 58 líneas celulares correspondientes a un total de 136.460 firmas. Para minimizar la redundancia de los perturbágenos que tienen muchas firmas en diferentes dosis y tiempo de tratamiento dentro de la misma línea celular, se ensambló una firma categorizada como "ejemplar" para cada perturbágeno en cada línea celular. Estas firmas están anotadas en CLUE y

generalmente se eligen en función de la TAS (Puntuación de Actividad Transcripcional), de forma que la firma con la TAS más alta se elige como ejemplar.

Para el trabajo realizado se utilizó la base de datos **lincs2**. Las puntuaciones de similitud y estadísticas que se obtienen de la búsqueda con **lincs2** son los siguientes [66]:

- **WTCS**: Puntuación de conectividad ponderada; es una ES bidireccional para un conjunto de consulta ascendente/descendente.
- **WTCS_Pval**: valor p nominal de WTCS.
- **WTCS_FDR**: tasa de falsos descubrimientos de WTCS_Pval; el valor p nominal del WTCS y la correspondiente tasa de falsos descubrimientos (FDR) se calculan comparando el WTCS con una distribución nula de valores WTCS obtenidos a partir de un gran número de consultas aleatorias (por ejemplo, 1000).
- **NCS**: puntuación de conectividad normalizada; para que las puntuaciones de conectividad sean comparables entre tipos de células y tipos de fármaco, las puntuaciones se normalizan. Dado un vector de valores WTCS resultante de una consulta, los valores se normalizan dentro de cada línea celular (c) y el tipo de fármaco (t) para obtener la puntuación de conectividad normalizada (NCS), dividiendo el valor WTCS por la media de los valores WTCS con el mismo signo en el subconjunto de firmas de la base de datos de referencia correspondiente a c y t.

Respecto a las bases de datos, su historia se remonta a Lamb et al. (2006), que generaron una de las primeras bases de datos GES, denominada CMAP. Inicialmente, incluía GES de 164 fármacos analizados en cuatro líneas celulares de mamíferos (Lamb et al. 2006). Unos años más tarde, CMAP se amplió a CMAP2, que contenía GES de 1.309 fármacos y ocho líneas celulares. Las bases de datos CMAP/CMAP2 utilizan los Gene Chips de Affymetrix como plataforma de expresión.

El consorcio *Library of Network-Based Cellular Signatures* (LINCS) publicó una base de datos GES mucho mayor [66]. En su versión inicial, la base de datos LINCS contenía GES basadas en perturbaciones para 19.811 fármacos probados en hasta 70 líneas celulares cancerosas y no cancerosas junto con experimentos de perturbación genética para varios miles de genes. El número de dosis y tiempos de tratamiento por compuesto considerados en los ensayos también se multiplicaron por 10-20.

Para escalar de unos pocos miles a muchos cientos de miles de GES, el Consorcio LINCS utiliza ahora el ensayo L1000. Esta tecnología se basa en la obtención de los niveles de expresión de un conjunto de genes considerados como una representación reducida del genoma. Se trata de un experimento a gran escala de expresión génica que mide la abundancia de los mRNA de 978 genes denominados genes de referencia de la especie humana, utilizando beads de 500 colores de Luminex (dos transcritos son detectados por cada bead de color). A partir de los resultados obtenidos de estos genes representativos se aplicó un algoritmo de inferencia para inferir la expresión de otros 11.350 genes del transcriptoma. También se midieron en este experimento la expresión de 80 genes invariantes como control, cuya expresión permaneció sin alterar en las condiciones medidas. Las condiciones experimentales que se recogían en este ensayo agrupaban a 51.219 perturbágenos, 76 líneas celulares, 89 dosis y 12 tiempos distintos, lo que hace un total de 1.3 millones de firmas distintas [67,68]. El proyecto LINCS se amplió, lo que ofrece nuevas oportunidades para explorar los MoA de un gran número de fármacos conocidos y

de pequeñas moléculas experimentales similares a fármacos. En 2020, la base de datos LINCS 2017 se amplió a la versión beta, aquí denominada LINCS2. Contiene más de 80.000 perturbaciones, más de 200 líneas celulares y más de 3 millones de perfiles de expresión génica. Esto representa una expansión de aproximadamente 3 veces la base de datos LINCS 2017.

3.1.2. Enriquecimiento funcional

Para llevar a cabo una estrategia de enriquecimiento funcional, lo primero que se hace es ordenar los resultados obtenidos anteriormente por el valor NCS, los cuales se han filtrado previamente para quedarse con aquellos con una correlación negativa (NCS negativo) y con un WTCS_FDR significativo, es decir $WTCS_FDR < 0.05$.

Los resultados de GESS son listas de perturbadores (en este caso, fármacos) clasificados por su similitud con una GES-Q de interés. La interpretación de estos resultados de búsqueda con respecto a las redes y vías celulares afectadas por los fármacos mejor clasificados es difícil. Para superar este reto, se puede utilizar el conocimiento de las proteínas diana de los fármacos mejor clasificados para realizar un análisis de enriquecimiento funcional (FEA) basado en sistemas de anotación comunitarios, como Gene Ontologies (GO), vías (por ejemplo, KEGG, Reactome), MOA de fármacos o dominios Pfam. Para ello, los conjuntos de fármacos clasificados se convierten en conjuntos de genes/proteínas diana para realizar un Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos Diana (TSEA) basado en un sistema de anotación elegido. Para el presente proyecto, el enriquecimiento funcional se realizó por medio del TSEA.

Es importante destacar que las duplicaciones en los datos del TSEA se deben al hecho de que muchos fármacos comparten las mismas proteínas diana. Los métodos de enriquecimiento estándar eliminarían estas duplicaciones, ya que asumen la unicidad en los conjuntos de prueba. Eliminar las duplicaciones en el TSEA sería inapropiado ya que borraría una de las piezas de información más importantes de este enfoque. Para resolver este problema, el paquete de signatureSearch ha desarrollado e implementado un método de ponderación para dianas duplicadas, donde la ponderación es proporcional a la frecuencia de los objetivos en el conjunto de prueba.

Para realizar TSEA, las anotaciones de fármacos-objetivo son esenciales. Se pueden obtener de varias fuentes, como DrugBank, ChEMBL, STITCH y el conjunto de datos Touchstone del proyecto LINCS [66,69,70,71]. La mayoría de las anotaciones de fármacos proporcionan identificadores UniProt para las proteínas diana. Se pueden asignar, si es necesario a través de sus genes codificantes, a las categorías de anotación funcional elegidas, como GO o KEGG. Para minimizar el sesgo en TSEA, puede ser beneficioso eliminar fármacos o dianas que se unen a un gran número de proteínas o fármacos distintos, respectivamente. Para llevar a cabo TSEA de manera eficiente, signatureSearch y su paquete de ayuda signatureSearchData proporciona varias utilidades junto con recursos de búsqueda de fármaco-objetivo para automatizar el mapeo de conjuntos de fármacos a conjuntos de objetivos a categorías funcionales. Para el proyecto, los sistemas de anotación que se utilizaron fueron las vías de GO, KEGG y REACTOME. El signatureSearch realiza una modificación de los tres algoritmos ampliamente utilizados para aprovechar la información de duplicación presente en los conjuntos de pruebas utilizados para TSEA. Los

algoritmos de enriquecimiento especializados incluyen Duplication Adjusted Hypergeometric Test (dup_hyperG), Modified Gene Set Enrichment Analysis (mGSEA) y MeanAbs (mabs).

La mayoría de las pruebas FEA que incluyen proteínas en sus conjuntos de pruebas se realizan a nivel de gen en signatureSearch. De esta forma se evitan duplicaciones adicionales debidas a las relaciones múltiples entre proteínas y sus genes codificantes. Para ello, las funciones correspondientes en el paquete de signatureSearch normalmente traducen los conjuntos de proteínas objetivo a sus conjuntos de genes codificantes utilizando recursos de mapeo de identificadores de R/Bioconductor, como el paquete de anotación org.Hs.eg.db.

3.1.2.1. Prueba hipergeométrica

La prueba hipergeométrica clásica asume la unicidad en sus conjuntos de prueba de genes/proteínas. Su valor p se calcula según la ecuación:

$$p = \sum_{k=x}^n \frac{\binom{D}{k} \binom{N-D}{n-k}}{\binom{N}{n}}$$

En el caso del análisis de enriquecimiento de términos GO, a las variables individuales se les asignan los siguientes componentes. N es el número total de genes/proteínas contenidos en todo el universo de anotación; D es el número de genes anotados en un nodo GO específico; n es el número total de genes del conjunto de prueba; y x es el número de genes del conjunto de prueba anotados en un nodo GO específico. Para mantener la información de duplicación en los conjuntos de prueba utilizados para TSEA, los valores de n y x en la ecuación anterior se ajustan en función de la frecuencia de las proteínas objetivo en el conjunto de prueba. Efectivamente, el enfoque elimina las duplicaciones, pero mantiene su información de frecuencia en forma de valores de ponderación.

Las columnas de la tabla de resultados, extraídas del objeto feaResult, contienen la siguiente información.

- **ont**: en el caso de GO, uno de BP, MF, CC o ALL;
- **ID**: GO o KEGG IDs;
- **Description**: descripción de la categoría funcional;
- **pvalue**: valor p bruto de la prueba de enriquecimiento;
- **p.adjust**: valor p ajustado para pruebas de hipótesis múltiples basado en el método especificado en pAdjustMethod;
- **qvalue**: valor q calculado con la función qvalue de R para controlar FDR;
- **itemID**: ID de elementos (genes para TSEA, fármacos para DSEA) que se solapan entre los conjuntos de prueba y anotación;
- **setSize**: tamaño de la categoría funcional;
- **GeneRatio**: proporción de genes del conjunto de prueba que están anotados en un nodo GO o una vía KEGG específicos;
- **BgRatio**: proporción de genes de fondo que están anotados en un nodo GO o una vía KEGG específicos;
- **Count**: número de genes solapados entre el conjunto de prueba y el término de anotación funcional específico.

3.1.2.2. Método mGSEA

El método GSEA original propuesto por Subramanian et al. (2005) [72] utiliza conjuntos de genes predefinidos S por sistemas de anotación funcional como GO y KEGG. El objetivo es determinar si los genes de S están distribuidos aleatoriamente en una lista de genes de prueba clasificada L (por ejemplo, todos los genes clasificados por logFC) o enriquecidos en la parte superior o inferior de la lista de prueba. Esto se expresa mediante una puntuación de enriquecimiento (ES) que refleja el grado en que un conjunto S está sobrerrepresentado en los extremos de L .

Para TSEA, la consulta es un conjunto objetivo en el que deben mantenerse las entradas duplicadas. Para realizar GSEA con soporte de duplicación, denominado aquí mGSEA, el conjunto de objetivos se transforma en una lista de objetivos clasificados por puntuación L_{tar} de todos los objetivos proporcionados por el sistema de anotación correspondiente. Para cada objetivo, su frecuencia se divide por el número de objetivos en el conjunto de objetivos, que es el peso de ese objetivo. En el caso de los objetivos presentes en el sistema de anotación, pero ausentes en el conjunto de objetivos de la prueba, su puntuación se establece en 0. De este modo, a cada objetivo del sistema de anotación se le asignará una puntuación y, a continuación, se ordenará de forma decreciente para obtener L_{tar} .

En el caso de TSEA, el método GSEA original no puede utilizarse directamente, ya que existe una gran proporción de 0 en L_{tar} . Si las puntuaciones de los genes del conjunto S son todas 0, N_R (suma de las puntuaciones de los genes del conjunto S) será 0, lo que no puede utilizarse como denominador. En este caso, ES se establece en -1. Si sólo algunos genes del conjunto S tienen puntuaciones de ceros, entonces N_R se establece en un número mayor para disminuir el peso de los genes de S que tienen puntuaciones distintas de cero.

$$N_R = \sum_{g_j \in S} |r_j|^p + \min(r_j | r_j > 0) * \sum_{g_j \in S} I_{r_j=0}$$

r_j : score of gene j in L_{tar} ; $p = 1$

La razón de esta modificación es que si sólo un gen del conjunto de genes S tiene una puntuación distinta de cero y este gen ocupa una posición alta en L_{tar} , el peso de este gen será 1, lo que dará como resultado un $ES(S)$ cercano a 1. Por lo tanto, el método GSEA original puntuará el conjunto de genes S como significativamente enriquecido. Sin embargo, esto no es deseable porque en este ejemplo sólo se comparte un gen entre el conjunto objetivo y el conjunto de genes S . Por lo tanto, dar pesos pequeños a los genes en S que tienen puntuaciones de 0 disminuiría el peso de los genes en S que tienen puntuaciones distintas de 0, disminuyendo así la tasa de falsos positivos. Para favorecer los términos GO y las vías KEGG realmente enriquecidos (conjunto de genes S) en la parte superior de L_{tar} sólo se seleccionan los conjuntos de genes con ES positivos.

Con este método se obtienen los resultados que se comentan a continuación, además de los mencionados en el apartado 3.1.2.1. Prueba hipergeométrica:

- **enrichmentScore**: ES del algoritmo GSEA (Subramanian et al. 2005). La puntuación se calcula recorriendo la lista de genes L , aumentando un estadístico de

suma corrida cuando encontramos un gen en S y disminuyendo cuando no lo está. La magnitud del incremento depende de la puntuación de los genes. La ES es la desviación máxima de 0 encontrada en el recorrido aleatorio. Corresponde a un estadístico ponderado de tipo Kolmogorov-Smirnov.

- **NES**: Puntuación de enriquecimiento normalizada. Las puntuaciones de enriquecimiento positivo y negativo se normalizan por separado, permutando la composición de la lista de genes L $nPerm$ y dividiendo la puntuación de enriquecimiento por la media de la permutación ES con el mismo signo.
- **pvalor**: El valor p nominal del ES se calcula utilizando una prueba de permutación. En concreto, se permuta la composición de la lista de genes L y se vuelve a calcular el ES del conjunto de genes para los datos permutados generando una distribución nula para el ES . A continuación, se calcula el valor p del ES observado en relación con esta distribución nula.
- **leadingEdge**: Genes del conjunto de genes S (categoría funcional) que aparecen en la lista clasificada L , pudiendo ser en o antes del punto en el que la suma acumulada alcanza su máxima desviación de 0. Puede interpretarse como el núcleo de un conjunto de genes que explica la señal de enriquecimiento.
- **ledge_rank**: Rangos de genes en 'leadingEdge' en la lista de genes L .

3.1.2.3. Método MeanAbs

La entrada para el método MeanAbs es $Ltar$ igual que para mGSEA. En este estadístico de enriquecimiento, $mabs(S)$ de un conjunto de genes S se calcula como las puntuaciones absolutas medias de los genes en S [73]. Para ajustar las variaciones de tamaño en el conjunto de genes S se realizan 1000 permutaciones aleatorias de $Ltar$ para determinar $mabs(S, \pi)$. Posteriormente, $mabs(S)$ se normaliza restando la mediana de $mabs(S, \pi)$ y dividiéndola por la desviación típica de $mabs(S, \pi)$ obteniendo las puntuaciones normalizadas $Nmabs(S)$. Por último, la parte de $mabs(S, \pi)$ que es mayor que $mabs(S)$ se utiliza como valor p nominal. Los valores p nominales resultantes se ajustan para pruebas de hipótesis múltiples utilizando el método Benjamini-Hochberg [74].

A continuación, se describen las columnas específicas del algoritmo mabs:

- **mabs**: Dada una lista de genes L $mabs(S)$ representa la puntuación media absoluta de los genes del conjunto S .
- **Nmabs**: $mabs(S)$ normalizado.

3.2. Perfiles de expresión diferencial de pacientes con enfermedad de Alzheimer

El Laboratorio de Biomedicina Computacional (LBC) del CIPF proporcionó los perfiles de expresión diferencial consenso de los distintos sexos con EA. Los perfiles consenso se obtuvieron mediante un metaanálisis de 10 estudios transcriptómicos independientes, con un total de 1.733 muestras *post mortem* de pacientes con EA y pacientes sanos. Estos perfiles tienen una gran robustez estadística puesto que provienen de la síntesis cuantitativa de resultados independientes.

Para identificar la muestra como hombre o mujer se definió la variable sexo asumiendo las variaciones cromosómicas y las hormonas gonadales como las principales contribuyentes a

la variedad fisiológica y biológica entre mujeres y hombres, sin tener en cuenta la combinación de factores sociales, culturales y ambientales que determinan el género [75].

Dado que las disparidades anatómicas, funcionales y en la composición celular de las diferentes regiones cerebrales se plasman en el transcriptoma, se obtuvieron por separado los perfiles consenso por sexo para dos regiones cerebrales distintas: el hipocampo (HP), la cual es una de las primeras regiones cerebrales que se ve dañada por los mecanismos patogénicos asociados con la EA de inicio tardío, y la corteza cerebral (CT).

Es por ello que para el trabajo se tuvieron en cuenta 4 perfiles de expresión diferencial consenso que permiten en este trabajo identificar potenciales fármacos con capacidad de reversión específica por sexo y región cerebral:

- Mujeres_CT: (AD.female - Control.female)
- Mujeres_HP: (AD.female - Control.female)
- Hombres_CT: (AD.male - Control.male)
- Hombres_HP: (AD.male - Control.male)

Con cada perfil se estableció una firma de genes característica del fenotipo. La selección de los genes incorporados y el tamaño del conjunto de los mismos son determinantes en el rendimiento de las métricas de similitud para la identificación de verdaderas conexiones entre enfermedad-fármaco. En relación a este, se tuvo en cuenta aquellos genes comunes con los perfiles de expresión génica de los fármacos con una mayor asociación con la variable fenotípica: genes diferencialmente sobreexpresados e infraexpresados de manera significativa, considerándose una tasa de descubrimiento falso o FDR menor a 0.05.

4. Resultados

Tras realizar los diferentes pasos definidos anteriormente, se obtuvo un listado de fármacos que revertía la enfermedad para cada región definida previamente (córtex e hipocampo) para cada sexo.

Con este listado de fármacos, se realizó el enriquecimiento funcional con diferentes métodos, con el fin de poder comparar los diferentes resultados obtenidos con los métodos seleccionados.

4.1 Conectividad enfermedad-fármaco

Como se detalló en el apartado “3.2. Perfiles de expresión diferencial de pacientes con enfermedad de Alzheimer”, a partir de los perfiles de expresión diferencial consenso para cada sexo y región cerebral, definimos la firma de genes considerando aquellos que presentan una mayor asociación con el fenotipo, genes diferencialmente sobreexpresados e infraexpresados de manera significativa. En la tabla 3 se muestra el tamaño de la firma de genes para cada sexo y región cerebral.

Tabla 3. Definición de la firma de genes de enfermedad por sexo y región cerebral: CT: córtex; HP: hipocampo; GS: genes diferencialmente expresados de manera significativa ($FDR < 0.05$); GS up: sobreexpresados; GS down: infraexpresados.

Región	Variable sexo	GS	GS up	GS down
CT	Hombre	228	107	121
	Mujer	214	108	106
HP	Hombre	118	11	107
	Mujer	210	105	105

A continuación, se muestra un análisis detallado de los resultados obtenidos por región cerebral, realizándose la correspondiente comparativa por sexo. Para cada fármaco identificado se indica el MOA y su estado de uso. Finalmente, se muestran los resultados obtenidos del enriquecimiento funcional de los genes diana de los fármacos, con un análisis comparativo de los 20 primeros términos GO y rutas Reactome y KEGG obtenidas para cada uno de los sexos. Aquellos fármacos para los cuales no se dispuso de la información de su MOA o genes de interacción fueron excluidos del análisis.

4.1.1 Fármacos identificados en el córtex

En las tablas 4 y 5 se muestra el listado de fármacos identificados, así como su MOA, a partir de los perfiles de expresión diferencial derivados del CT en mujeres y hombres, respectivamente.

Los dos primeros fármacos de la lista obtenida en mujeres (tabla 4), la Protionamida y el VTP-27999, tienen mecanismos de acción totalmente distintos. Mientras que el primero es un antibiótico de segunda línea frente a micobacterias y está aprobado, el segundo solo se puede usar de manera experimental y es un inhibidor de la renina, hormona producida en los riñones que suele secretarse en casos de hipotensión arterial y de baja volemia.

La Protionamida se ha demostrado que es un potente inhibidor de la formación *in vitro* de amiloides en la insulina humana y la A β 42 y que protege a las células de neuroblastoma cultivadas contra los efectos tóxicos de los amiloides. Con el estudio realizado [76], se demostró que ejerce su función anti-amiloide estabilizando las proteínas en su estado nativo. Su comportamiento citoprotector podría atribuirse a sus propiedades antioxidantes y a su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica *in vitro*, como confirman diversos ensayos antioxidantes. Esta estabilización de la estructura nativa podría deberse a la unión de PTA y ETA a los aminoácidos de las regiones amiloidogénicas de HI y A β 42 e impidiendo que las proteínas formen láminas β . Además, una de las ventajas de este fármaco es que cruza la barrera hematoencefálica.

Otro de los fármacos que aparece en la lista es la Bupivacaína, un anestésico local aprobado que bloquea los canales de sodio activados por voltaje al unirse a SCN10A, inhibe los receptores de glutamato ionotrópicos y activa la AMPK. Una de las características de la EA es la hiperexcitabilidad neuronal debida a la estimulación de los potenciales de acción, que provoca la pérdida de transmisión de la señal eléctrica y, en última instancia, la muerte neuronal. Al aumentar la excitabilidad neuronal, la Bupivacaína puede actuar sobre los canales de sodio para suprimir los potenciales de acción neuronal. Además, SCN1A, que conecta con SCN10A en la red PPI, está regulada por BACE1, la enzima de escisión de la proteína precursora de amiloide del sitio beta para la generación de péptidos A β en la EA. PSEN1, un componente de la γ -secretasa que produce A β , también interviene en la escisión proteolítica de las subunidades β de los canales de sodio dependientes de voltaje. En cuanto a la activación de la AMPK, la Bupivacaína podría estar asociada con la captación de glucosa mediada por insulina o la fosforilación de Tau a través de la vía AMPK/TSC2/mTOR1/p70s6k. Se sabe que la Bupivacaína activa la AMPK junto con la fosforilación de T172, y la AMPK activada media la fosforilación de S1387 en TSC2 que inicia una fuerte activación de la vía AMPK/TSC2. mTOR1, un regulador central del crecimiento y el metabolismo celular, es inhibido por la AMPK/TSC2 activada. La actividad p70s6k dependiente de mTOR también inhibe y media la fosforilación de Tau, que es crucial en la patogénesis de la EA. Además, la AMPK activada inhibe la activación de GSK3 β , una quinasa principal de Tau [77,78]. Combinando todo esto, es una propuesta de mecanismo de acción de la Bupivacaína para el tratamiento de la EA propuesto por Soo Youn Lee y *col.* [79]. Que aparezca en el listado del proyecto es otra confirmación de su posible uso como fármaco frente a la EA.

Tabla 4. Propiedades farmacológicas de los fármacos identificados en mujeres a partir de los perfiles de expresión del CT.

Fármaco	Mecanismo de acción	Estado
Protionamida	Inhibidor de la enoil-[proteína transportadora de acil] reductasa [NADH] (inhA) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Aprobado

VTP-27999	Inhibidor de renina de alquilamina	Experimental
SANT-2	Antagonista de los receptores de Smoothened	Experimental
Genisteína	Inhibidor de la tirosina quinasa	Investigación
Bupivacaína	Bloqueo de canales del sodio	Aprobado
Ácido acexámico	Agente reductor; Inhibidor de la gastrina; Inhibidor de la 5 alfa reductasa	Aprobado
ATN-161	Inhibidor de la integrina	Experimental
Loratadina	Inhibidor de la histamina H1	Aprobado
Balaglitazona	Sensibilizador a la insulina; Agonista parcial del receptor PPAR	Investigación
GW-788388	Inhibidor potente y selectivo de ALK5; Inhibe las actividades del receptor de TGF- β tipo II y del receptor de activina tipo II	Experimental
Sulbactam	Inhibidor de la betalactamasa	Aprobado
K-02288	Inhibidor del receptor de proteína morfogenética Ósea (BMP) tipo I	Experimental
Losartan	Antagonista de los receptores de angiotensina	Aprobado
Capsaicina	Agonista del receptor TRPV1.	Aprobado
Clozapina	Antagonismo de los receptores de dopamina de tipo 2 (D2) y de serotonina de tipo 2A (5-HT2A).	Aprobado

	Antagonista de los receptores adrenérgicos, colinérgicos, histaminérgicos y de otros receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos.	
Picotamida	Antagonista de los receptores de tromboxano; Inhibidor de la tromboxano sintasa	Experimental
Fomepizol	Inhibidor de la alcohol deshidrogenasa	Aprobado
Semaxanib	Inhibidor del VEGFR(Vascular Endothelial Growth Factor); Inhibidor del receptor del factor de crecimiento de células madre	Investigación
Metocarbamol	Inhibidor de la anhidrasa carbónica I.	Aprobado
Resatorvid	Antagonista de los receptores Toll-like	Investigación

En el caso de los hombres (tabla 5) se puede observar que en el listado aparecen fármacos que tienen el mismo mecanismo de acción, remarcando los siguientes:

- Inhibidores de quinasas: 2
- Inhibidores de histonas deacetilasas: 3

Entre estos fármacos identificados cabe resaltar el XMD-1150, un inhibidor de la quinasa de repetición rica en leucina (LRRK2). Estudios recientes en modelos *in vivo* han demostrado por primera vez que la actividad de la quinasa LRRK2 participa en la neuroinflamación relacionada con la EA y, por tanto, este fármaco podría ser utilizado para la EA [80].

Respecto a los fármacos inhibidores de histonas deacetilasas (HDACs), numerosos estudios identificaron niveles elevados de histonas deacetilasas en pacientes con EA. Las HDACs están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis neuronal a través de un equilibrio en los niveles de HDACs/HATs (Histona acetiltransferasas). Hoy en día están siendo una de las dianas para encontrar nuevos mecanismos de acción para abordar la EA [81].

Tabla 5. Propiedades farmacológicas de los fármacos identificados en hombres a partir de los perfiles de expresión del CT

Fármaco	Mecanismo de acción	Estado
XMD-1150	Inhibidor de la quinasa de repetición rica en leucina	Experimental

Ipriflavona	Inhibidor de la resorción ósea	Experimental
Dacinostat	Inhibidor de la histona deacetilasa.	Investigación
Terbinafina	Inhibe la enzima escualeno monooxigenasa	Aprobado
Pracinostat	Inhibidor de la histona deacetilasa.	Investigación
Topiroxostat	Inhibidor selectivo de la xantina oxidasa	Experimental
Dietilcarbamazina	Inhibidor de la lipoxigenasa	Aprobado
ATN-161	Inhibidor de la integrina	Experimental
CP-724714	Inhibidor del EGFR; Inhibidor de la tirosina quinasa	Experimental
Balaglitazona	Sensibilizador a la insulina; agonista parcial del receptor PPAR	Investigación
Cafeína	Antagonista de los receptores de adenosina; Diurético; Inhibidor de la fosfodiesterasa	Aprobado
Quinina	Inhibidor de la biocristalización de la hemozoína	Aprobado
Candesartan	Antagonista de los receptores de angiotensina	Experimental
Darinaparsin	Estimulante de la apoptosis	Investigación
Estradiol	Agente anticonceptivo; Agonista del receptor de estrógeno	Aprobado
Capsaicina	Agonista del receptor TRPV1 (canal iónico)	Aprobado

Protoporfirina IX	Inhibidor de la hemooxigenasa	Experimental
Loratadina	Inhibidor de histamina H1	Aprobado
Quisinostat	Inhibidor de la histona deacetilasa.	Investigación
Oxiconazol	Inhibe la biosíntesis del ergosterol; Inhiben la síntesis de ADN; Suprimen las concentraciones intracelulares de ATP	Aprobado

A partir de los genes diana de los fármacos identificados realizamos un enriquecimiento funcional basado en la ontología de procesos biológicos de la GO, así como de las rutas Reactome y KeGG.

SignatureSearch realiza una modificación de los tres algoritmos ampliamente utilizados para aprovechar la información de duplicación de genes diana presente en los conjuntos de pruebas utilizados para TSEA. Los algoritmos de enriquecimiento especializados incluyen *Duplication Adjusted Hypergeometric Test* (dup_hyperG), *Modified Gene Set Enrichment Analysis* (mGSEA) y *MeanAbs* (mabs). Por ello, en las siguientes figuras (figuras 7-10) aparecen los 3 algoritmos modificados.

Si observamos los resultados obtenidos del enriquecimiento funcional basado en la ontología de proceso biológico de la GO (Figura 7), podemos decir que con el algoritmo de enriquecimiento especializado dup_hyperG se obtienen un menor número de términos o rutas significativos. En el caso de las mujeres (Figura 7a), con el dup_hyperG encontramos 4 términos o rutas significativas, siendo dos relacionadas con la serotonina, y dos con la vasoconstricción. Existen muchos artículos que indican que modular el sistema serotoninérgico puede ser usado como estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de la EA [82]. Respecto a la vasoconstricción, la vasoconstricción cerebral puede provocar un desequilibrio entre la oferta y la demanda metabólica neuronal, precipitando finalmente la hipoperfusión cerebral y contribuyendo a la lesión cerebral y al deterioro cognitivo en la EA [83]. Respecto a los otros algoritmos, el mabs proporciona todas las rutas que aparecen como significativas mientras que el mGSEA no da ninguna como significativa.

En el caso de los hombres, muchas de las rutas son catabólicas y relacionadas con histonas deacetilasas (Figura 7 b). Al igual que ocurría con las mujeres en el GO, el algoritmo que no proporciona ningún término significativo es el mGSEA, mientras que el mabs indica que todos son significativos. Al igual que en el caso de las mujeres, nos centraremos en el dup_hyper G, el cual considera significativos los genes implicados en procesos catabólicos y metabólicos de purinas y nucleótidos, de histonas desacetilasas

(H3-H4), y rutas relacionadas con el metabolismo de xenobióticos y metabolismo de fármacos.

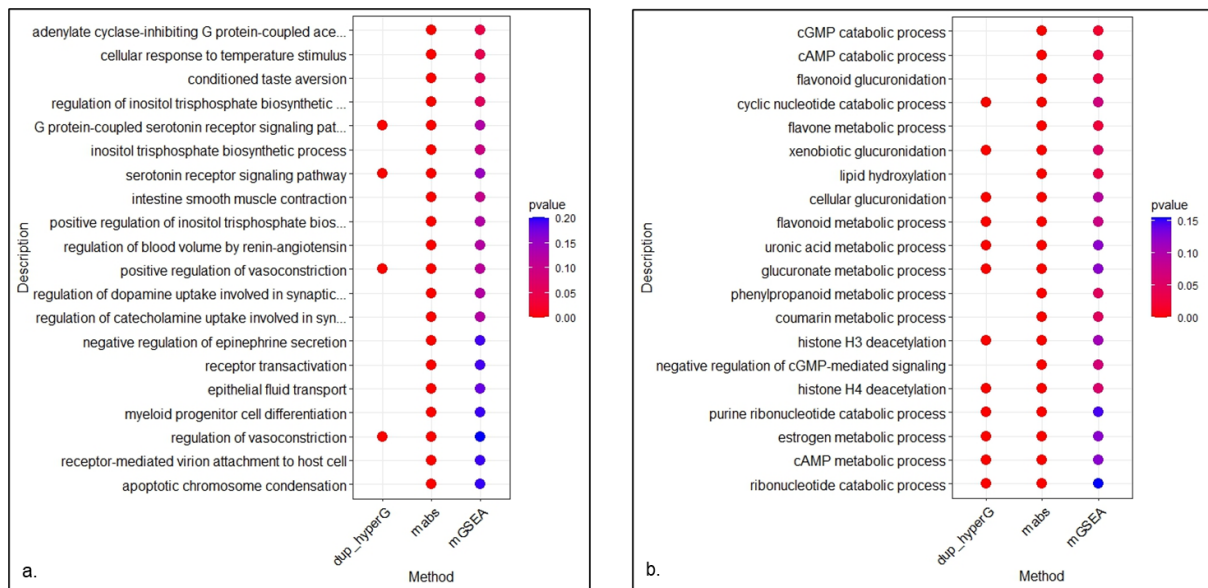


Figura 7. Enriquecimiento funcional basado en la ontología de proceso biológico de la GO en el CT, a)mujeres, b)hombres.

Respecto a los resultados obtenidos con las rutas KEGG (Figura 8 a,b), el mGSEA tampoco proporciona rutas significativas, mientras que el método dup_hyperG y mabs proporcionan los mismos resultados significativos. En el caso de las mujeres, muchas de estas rutas están relacionadas con el citocromo P450, cánceres, y sinapsis, mientras que en los hombres, las rutas son variadas aunque aparece también la del citocromo P450.

Los genes del citocromo P450 del cerebro son los principales reguladores del metabolismo del colesterol, las hormonas sexuales y los xenobióticos. La familia CYP humana consta de 57 genes, la mayoría de los cuales codifican enzimas. Estas enzimas están implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos, el colesterol, los ácidos biliares y los fármacos, lo que sugiere una relación con la patogénesis de la EA. En el artículo de Bahado-Singht *et al.*, evaluaron los cambios en la metilación del ADN basados en la citosina ('CpG') en la EA.. Investigaron mecanismos basados en CYP para la patogénesis de la EA y biomarcadores epigenéticos para la detección de la enfermedad. Las evidencias son claras en que el CYP tiene una implicación clara en la patogénesis de la EA, motivo por el cual aparece en los resultados de KEGG [84].

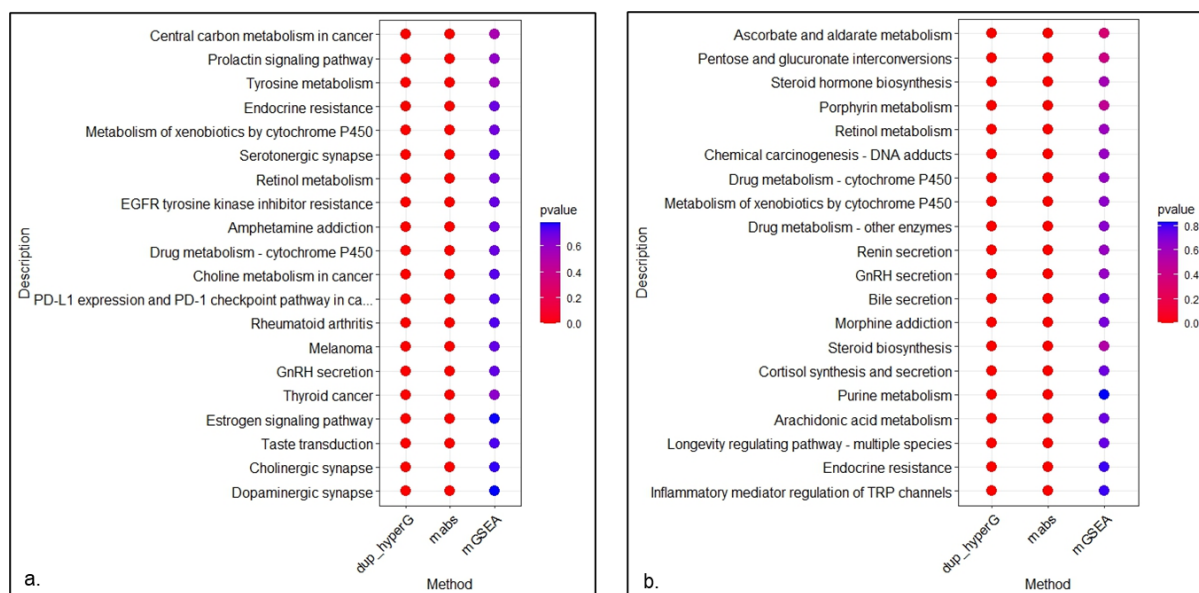


Figura 8. Enriquecimiento funcional basado en las rutas KEGG en el CT, a) mujeres, b) hombres.

En el caso de las rutas de Reactome (Figura 9), los algoritmos actúan distinto, ya que el mGSEA sí que proporciona rutas que considera significativas. En el caso de las mujeres, las rutas que coinciden con los tres algoritmos son aquellos genes implicados en los receptores de la serotonina, adrenoceptores, receptores muscarínicos y de la dopamina. Los estudios de John Cirrito e Yvette Sheline han demostrado que la activación de la neurotransmisión serotoninérgica podría ser beneficiosa en la EA [85]. La identificación de compuestos que bloqueen el ensamblaje de la proteína Tau, en ovillos neurofibrilares asociados a la desestabilización de las neuronas y la muerte celular podría ofrecer tratamientos farmacológicos contra la enfermedad EA. Los adrenoceptores funcionan en el sistema nervioso simpático y son los receptores de las catecolaminas, epinefrina (adrenalina), norepinefrina y dopamina. Diferentes estudios han demostrado que la utilización de fármacos compuestos de catecolaminas impide la agregación de la proteína Tau *in vitro*. Estos resultados proporcionan la motivación para la evaluación *in vivo* de los agonistas de los receptores β -adrenérgicos preexistentes como una terapia potencial para la EA a través de la reducción de la deposición de Tau [86].

En el caso de los hombres (Figura 9 b), los tres algoritmos coinciden con genes implicados en la biosíntesis de las maresinas. Las maresinas están dentro de los eicosanoides y docosanoides, que derivan de los ácidos grasos esenciales omega 6 y omega 3, es decir, ácidos grasos que el organismo no puede sintetizar y que deben aportarse mediante la dieta. A las maresinas se les asocia potentes propiedades antiinflamatorias, promueven la regeneración de los tejidos y el bloqueo del dolor. Además, a las maresinas se les ha clasificado dentro de un grupo mayor denominado mediadores preresolutivos especializados (SPM, por sus siglas en inglés, *Specialized Proresolving Mediators*).

La respuesta inflamatoria es un proceso autolimitado que produce una superfamilia de mediadores químicos, denominados SPM como las maresinas. Estos metabolitos estimulan la respuesta inflamatoria, la eliminación de microbios y el alivio del dolor, y promueven la regeneración tisular a través de mecanismos novedosos. Los SPM también modulan la neuroinflamación y las enfermedades neurodegenerativas asociadas al metabolismo de los

lípidos, como el Alzheimer. Las maresinas MaR1 alivian la neurodegeneración al promover la fagocitosis microglial de amiloide- β [87].

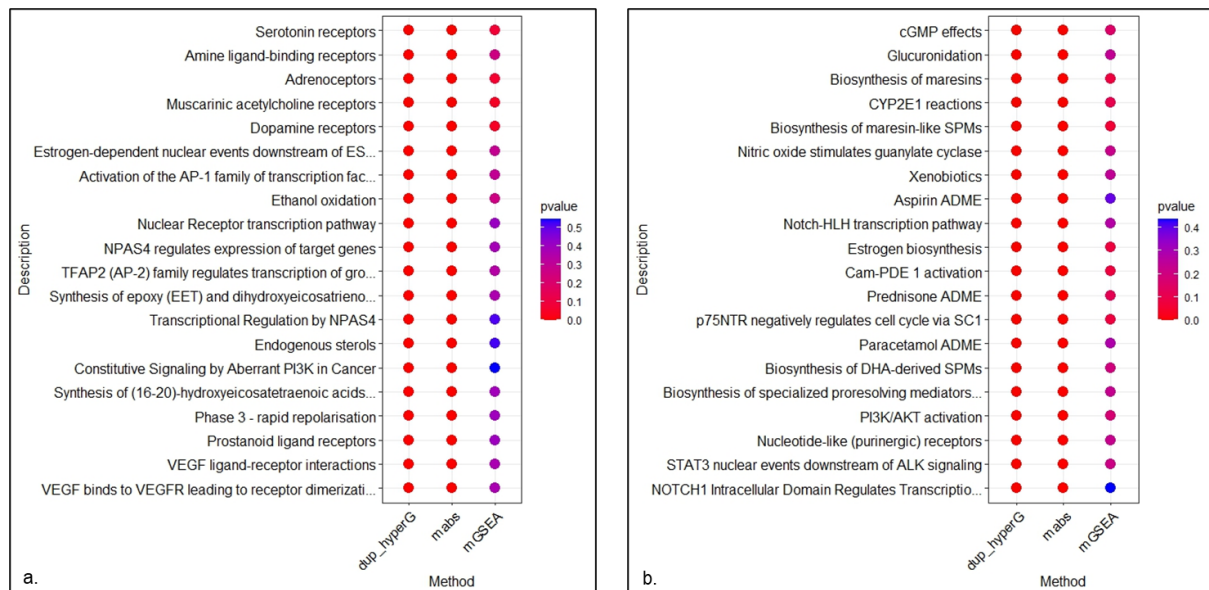


Figura 9. Enriquecimiento funcional basado en las rutas REACTOME en el CT, a) mujeres, b) hombres.

4.1.2 Fármacos identificados en el hipocampo

En las tablas 6 y 7 se muestra el listado de fármacos identificados a partir de los perfiles de expresión diferencial del HP en mujeres y hombres, respectivamente. En las mismas, al igual que en los análisis anteriores, se especifica su MoA y estado.

En la tabla 6 aparecen los fármacos identificados en mujeres. Lo primero que destaca es que de los 20 fármacos listados, 14 están aprobados. El primero es el Fulvestrant, un antagonista de los receptores de estrógenos indicado para el tratamiento del cáncer de mama metastásico con receptores hormonales (RH) positivos en mujeres posmenopáusicas con progresión de la enfermedad tras una terapia antiestrogénica.

El predominio femenino en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA) sugiere la implicación de factores específicos de sexo, como una menor señalización del receptor de estrógeno-estrógeno, en la patogénesis de la EA. El papel potencial de receptores de estrógenos (ER) en la patogénesis de la EA ha sido explorado por varios grupos con resultados mixtos. Se demostró que ER α interactúa con la proteína Tau *in vivo*. Los experimentos de inmunoprecipitación hallaron un aumento de la interacción ER- α -Tau en los casos de EA, lo que podría explicar el secuestro de ER- α en la patología neuronal de Tau. De hecho, la sobreexpresión de Tau en células M17 conduce a la interrupción de la señalización estrogénica. Estos datos apoyan la idea de que el secuestro de ER- α por la patología Tau subyace a la pérdida de neuroprotección estrogénica durante el curso de la EA [88].

Por otro lado, se identificaron un número apreciable de fármacos inhibidores de canales sodio, potasio y calcio. Un nivel elevado de calcio intracelular provoca disfunción neuronal, muerte celular y apoptosis. También se ha demostrado que la desregulación del calcio

aumenta la producción de proteína beta amiloide ($A\beta$), el sello distintivo de la EA [89]. Fármacos con este mecanismo de acción son susceptibles de ser nuevas estrategias para hacer frente a la EA.

Tabla 6. Propiedades farmacológicas de los fármacos identificados en mujeres a partir de los perfiles de expresión del HP.

Fármaco	Mecanismo de acción	Estado
Fulvestrant	Inhibidor estrógenos	Aprobado
Epotilon	Inhibidor de microtúbulos	Investigación
Alfaxalone	Agonista del receptor GABA	Aprobado
Salvinorin A	Agonista de los receptores opiáceos	Investigación
AZD-6482	Inhibidor de PI3K.	Investigación
Ketoconazol	Inhibición ergosterol	Aprobado
Dilazep	Inhibidor de la recaptación de adenosina	Experimental
Iloprost	Inhibidor de la agregación plaquetaria; Agonista del receptor prostanoides	Aprobado
Estriol	Agonista del receptor de estrógeno	Aprobado
Tropicamida	Antagonista de los receptores muscarínicos de la acetilcolina (mACh)	Aprobado
Flunarizina	Bloqueante de los canales de calcio	Aprobado
Oxcarbazepina	Bloqueante de los canales de sodio	Aprobado
Simvastatin	Inhibidor de la HMG-CoA reductasa	Aprobado
Penitrem-a	Bloqueante de los canales de potasio	Aprobado

Perfenazina	Inhibidor de receptores de dopamina D1 y D2	Aprobado
Cefixima	Inhibidor de la síntesis de la pared celular bacteriana	Aprobado
Danazol	Antagonista del receptor de estrógeno; Agonista del receptor de progesterona	Aprobado
XAV-939	Inhibidor de la tanquinasa (tankynase)	Experimental
Biperideno	Antagonista de los receptores de acetilcolina	Aprobado
Ranitidina	Antagonista H2 de la histamina	Retirado

Entre los fármacos identificados en hombres en la región del hipocampo (tabla 7) destacamos el primero de la lista, el Quinapril, fármaco inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina 1 (ECA-1) indicado para el tratamiento de la hipertensión. En los últimos años, cada vez hay más evidencias de la implicación del sistema renina-angiotensina en la patogénesis de EA. Estudios previos de autopsias han demostrado que las personas con EA tienen una mayor actividad de ECA-1), lo que resulta en una mayor conversión de angiotensina I (ANGI) en II (ANGII), un potente vasoconstrictor [90-92]. Del mismo modo, se observó que la disminución de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2) reducía la conversión de ANGII en el vasodilatador angiotensina 1-7 [93]. Todos estos cambios provocaron un aumento de los niveles de ANGII que causó una mayor activación del receptor de angiotensina tipo 1 (AGT1 R), la cual se asocia con la acumulación de amiloide- β ($A\beta$) e hiperfosforilación de tau, así como con la disminución de la liberación de acetilcolina, contribuyendo a la patogénesis de la EA. Además, en diversos estudios han demostrado que unos niveles basales elevados de ANGII se asocian con menores volúmenes totales de materia gris, hipocampo, frontal medio rostral y parietal supramarginal, todos asociados con la memoria y la función ejecutiva, independientemente del control de la presión arterial. Estos hallazgos están en consonancia con un estudio previo que muestra que las variantes del gen AGTR1, codificante del principal receptor de ANGII, se asocian con una pérdida acelerada del volumen del hipocampo durante un período de 4 años [94].

Al igual que en mujeres, en el mismo listado también identificamos fármacos inhibidores de canales iónicos como la Procainamida, o antagonistas de los receptores de dopamina y serotonina.

Tabla 7. Propiedades farmacológicas de los fármacos identificados en hombres a partir de los perfiles de expresión del HP.

Fármaco	Mecanismo de acción	Estado
Quinapril	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina	Aprobado
Resatorvid	Antagonista de los receptores Toll-like	Investigación
Procainamida	Bloqueante de los canales de sodio	Aprobado
Carbamazepina	Antiepiléptico; Bloqueante de los canales de sodio	Aprobado
Topiroxostat	Inhibidor selectivo de la xantina oxidasa	Experimental
Pirfenidona	Inhibidor del receptor TGF beta	Aprobado
Felbamato	Antagonista de los receptores de glutamato	Aprobado
Syrosingopine	Inhibidor del transportador vesicular de monoaminas	Experimental
Serdemetan	Inhibidor de MDM.	Investigación
Indometacina	Inhibidor de la ciclooxigenasa	Aprobado
Terbinafina	Inhibe la enzima escualeno monooxigenasa	Aprobado
NSC-23766	Inhibidor de Ras GTPasa	Experimental
Rasagilina	Inhibidor de la monoaminoxidasa	Aprobado
BH3I-1	Inhibidor de BCL. inhibe o detiene la muerte celular (antiapoptótico) Induce la apoptosis (inicio de la muerte celular).	Experimental
6-Aminochrysene	Inhibidor de la transferasa	Experimental

Rupatadina	Antagonista del receptor de histamina; Antagonista del receptor del factor activador de plaquetas	Aprobado
Lurasidona	Antagonista del receptor de la dopamina; Antagonista del receptor de la serotonina	Aprobado
MDL-72832	Antagonista del receptor de la serotonina	Experimental
CP-724714	Inhibidor del EGFR; Inhibidor de la tirosina quinasa	Experimental
Imexon	Induce la oxidación mitocondrial	Investigación

A partir de los genes diana de los fármacos identificados realizamos un enriquecimiento funcional basado en la ontología de proceso biológico de la GO, así como de las rutas Reactome y KEGG (figuras 11-14).

Al igual que en el enriquecimiento funcional de los términos GO realizado en CT, el algoritmo mabs identifica todos los 20 primeros términos como significativos, dup_hyperG en su mayoría, y el mGSEA ninguno.

Los términos GO identificados en mujeres (Figura 10 a), coincidentes en dup_hyperG y mabs, definen, en su mayoría, procesos asociados a la comunicación celular, así como al metabolismo de xenobióticos, ácido úrico, glucuronato y flavonoides.

En el caso de los hombres (Figura 10b), los términos GO en los que se agrupan el mayor número de genes diana son aquellos implicados en la despolarización de la membrana, potencial de acción neuronal y procesos catabólicos de fármacos.

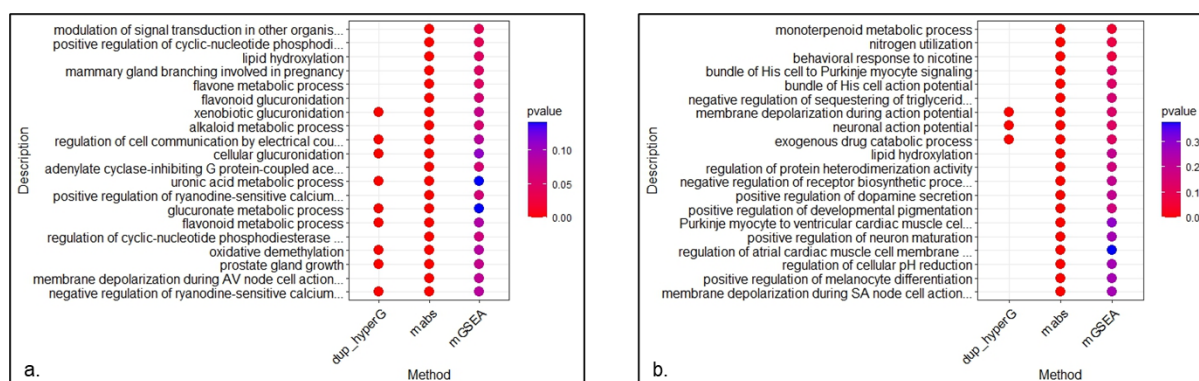


Figura 10. Enriquecimiento funcional basado en la ontología de proceso biológico de la GO en el HP, a) mujeres, b) hombres.

En el caso de las rutas KEGG, en las mujeres (Figura 11 a) los algoritmos dup_hyperG y mabs dan los mismos resultados, en el cual podemos encontrar rutas relacionadas con la síntesis de hormonas, con el citocromo P450 (mencionado anteriormente), la secreción de la renina e incluso rutas asociadas al cáncer de glioma.

En el caso de los hombres (Figura 11 b) aparecen rutas implicadas en la adicción a la cocaína y la nicotina. Coincide con las mujeres en rutas implicadas en el citocromo P450, y hormonas.

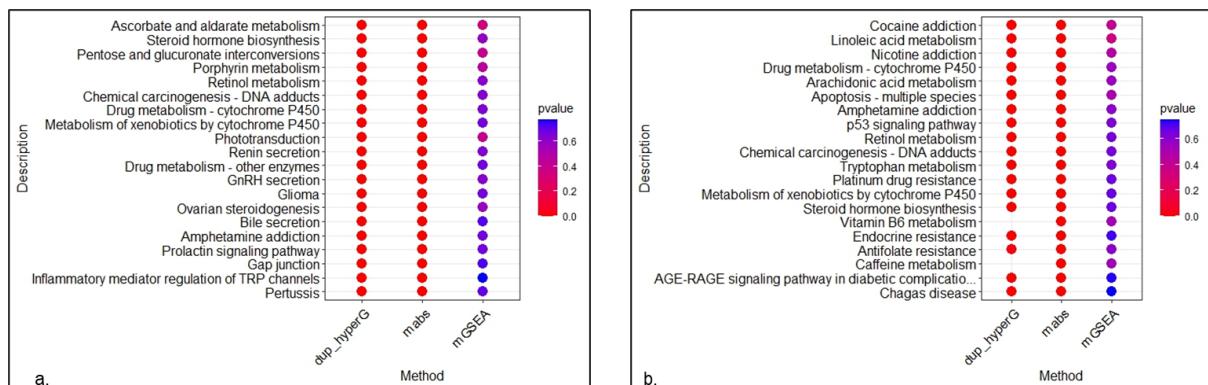


Figura 11. Enriquecimiento funcional basado en las rutas KEGG en el HP, a) mujeres b) hombres.

Respecto a las rutas encontradas para cada uno de los sexos por medio de Reactome (Figura 12 a, b) son distintas. Los tres algoritmos coinciden en al menos dos rutas significativas. En el caso de las mujeres (Figura 12 a) son rutas implicadas en receptores del ligando prostanoide y receptores muscarínicos.

En el caso de los hombres (Figura 12 b) son rutas implicadas en la síntesis de maresinas-SPM, las cuales ya habíamos mencionado anteriormente que estaban relacionadas con beneficios para la EA.

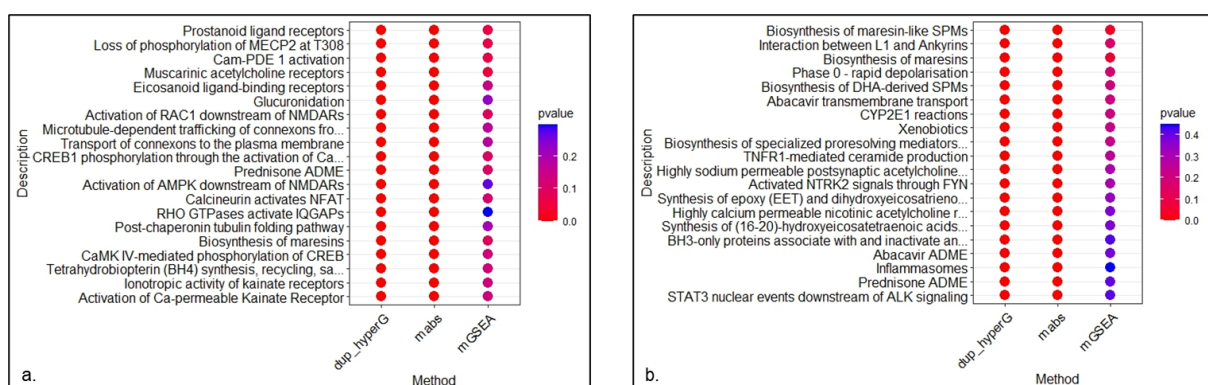


Figura 12. Enriquecimiento funcional basado en las rutas REACTOME en el HP, a) mujeres b) hombres.

5. Discusión

El desarrollo de medicamentos dirigidos a objetivos terapéuticos requiere un profundo entendimiento de la causa subyacente de la enfermedad. En el caso de la enfermedad de Alzheimer (EA), debido a su complejidad y variabilidad, actualmente no se comprende completamente su causa. No obstante, contamos con un sólido conocimiento de los diversos mecanismos patológicos o características fundamentales que están relacionados con la enfermedad, muchos de los cuales son compartidos con otros trastornos. Dado que aún no existen medicamentos que puedan modificar el curso de la enfermedad, en este estudio aplicamos una metodología de análisis computacional (RF *in silico*) basada en el principio de revertir los cambios en la expresión génica. Presentamos nuevas posibilidades de fármacos que podrían revertir el perfil de la enfermedad, teniendo en cuenta la región cerebral y considerando las diferencias de sexo. Una investigación que aborda de manera terapéutica el claro dimorfismo sexual presente en la enfermedad.

Para llevar a cabo el proyecto se ha utilizado la base de datos de lincs2, la cual cuenta con 80.000 perturbaciones, más de 200 líneas celulares y más de 3 millones de perfiles de expresión génica. Al pasar nuestro perfil de expresión génica, se obtuvo un listado de fármacos, seleccionando posteriormente los 20 primeros fármacos con puntuaciones de correlación más negativas. El análisis de la capacidad de reversión en función del fenotipo característico de la región cerebral nos ha permitido identificar fármacos específicos en la región del hipocampo y otros para el córtex cerebral (Tabla 8), así como fármacos específicos según la variable sexo (Tabla 9). En el caso del hipocampo observamos que las diferencias por sexo (Tabla 9) son más notorias que en el córtex, puesto que en esta región sí que existen fármacos que coinciden tanto para los hombres como para las mujeres (4). Si observamos solamente la región cerebral (Tabla 8), se identifican solamente 4 fármacos que coinciden tanto para el córtex como para el hipocampo.

Tabla 8. Sumatorio de fármacos. CT: córtex; HP: hipocampo.

Región	CT	HP
CT	32	4
HP	4	36

Tabla 9. Sumatorio de fármacos. CT: córtex; HP: hipocampo; M: mujer; H: hombre.

Región	Variable	M	H
CT	Mujer	16	4
	Hombre	4	16
HP	Mujer	20	0
	Hombre	0	20

De los distintos MoA identificados en los fármacos, uno de ellos está vinculado con el cáncer. Existen distintas investigaciones epidemiológicas que han mostrado que existe una relación inversa entre el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. Además, los análisis transcriptómicos revelan que la expresión de genes relacionados con el crecimiento y la proliferación celular se ve incrementada en el cáncer, mientras que experimentan una disminución en el caso de la EA [95]. No obstante, esta relación es distinta si se centra en gliomas, que es un tipo de cáncer que se desarrolla en el cerebro o la médula espinal. Estas dos enfermedades presentan características fisiopatológicas comunes, como es el daño en el ADN, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, desregulación metabólica e inflamación. Con esto se puede concluir que tienen un origen común, lo que influye en el riesgo de desarrollar la enfermedad [95].

Si nos focalizamos en las diferencias que existen en los sexos, el primer MOA del que se debe hablar es de los inhibidores de HDAC, puesto que esta categoría terapéutica exhibe una clara capacidad de reversión diferencial basada en el sexo. Estos reguladores epigenéticos se han identificado únicamente en todas las regiones cerebrales consideradas a partir de los perfiles consensuados obtenidos de muestras masculinas.

Las HDAC son enzimas que catalizan la eliminación de grupos acetilo de residuos de lisina en histonas y proteínas no histónicas, desempeñando un papel crucial en la regulación de la transcripción de genes asociados con procesos celulares fundamentales como son los genes para la proliferación, y genes implicados en la diferenciación y desarrollo celular. Es importante destacar que la regulación de las HDAC se relaciona estrechamente con dos factores epidemiológicos clave en la EA: la edad y el sexo. A medida que el paciente tiene más edad, se observa un incremento en la expresión de HDAC y su actividad enzimática, lo que tiene como resultado una disminución de los patrones de acetilación y, por ende, una disminución de la transcripción de genes vinculados a la plasticidad sináptica y la formación de memoria. Con todas estas evidencias, los autores indican que la edad sería un factor de riesgo significativo para la EA [96].

Sin embargo, se ha validado que la desregulación de los patrones de acetilación en la EA no es regular. Esta depende del progreso de la enfermedad y el tejido afectado, encontrando diferentes patrones epigenéticos, pudiendo ser con un incremento de niveles de acetilación y otros una disminución de la acetilación, todas ellas implicadas en diversos procesos patogénicos de la enfermedad. Hay cuatro clases de HDAC, que se diferencian por su localización a nivel celular y su manera de actuar. Los niveles de HDAC se ven alterados en pacientes con EA, notándose especialmente en las HDAC2, HDAC3 y HDAC6. La actividad de las dos primeras es reprimir la transcripción de zonas cerebrales específicas vinculadas con la memoria, el aprendizaje y la neuroplasticidad. La HDAC6 participa en la acetilación de la tubulina, que tiene una relación directa con la fosforilación y degradación de la proteína Tau. A las HDAC se les atribuye una gran relevancia en la regulación del dimorfismo sexual en la transcripción de genes, lo que explicaría la diferencia que existe entre mujeres y hombres en trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos [97-99], sirviendo el presente proyecto para constatar la importancia de estas enzimas en el dimorfismo sexual.

La predisposición de mujeres en el desarrollo de la EA sugiere la posible implicación de factores relacionados con el sexo, como una disminución en la señalización del receptor de

estrógeno-estrógeno, en el proceso de desarrollo de la EA. Varios grupos de investigación han investigado el posible papel de los receptores de estrógenos (ER) en la patogénesis de la EA, pero sus resultados han sido variados.

En un estudio se demostró la presencia de ER- α en las mismas áreas del cerebro afectadas por la patología neurofibrilar en la EA, así como su interacción con la proteína Tau en el entorno vivo. Los experimentos de inmunoprecipitación revelaron un aumento en la interacción entre el ER- α y la Tau en los casos de EA, lo que podría explicar la captura del ER- α en la patología neuronal de la Tau. De hecho, la sobreexpresión de Tau en células M17 condujo a la interrupción de la señalización estrogénica. Estos hallazgos respaldan la idea de que la captura del ER- α por la patología Tau subyace en la pérdida de la protección neuronal proporcionada por los estrógenos durante el curso de la EA [88].

En los listados de fármacos obtenidos a partir de las diferentes regiones cerebrales se han identificado un número considerable de agonistas de receptores de serotonina. No obstante, en hombres se han identificado en el hipocampo y en las mujeres a partir del córtex cerebral.

En cuanto al papel de la serotonina y la dopamina en las características patológicas de la EA [100], la señalización de la serotonina parece estar relacionada con los niveles de amiloide A β . Cirrito *et al.* descubrieron que los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) redujeron los niveles de amiloide A β en el líquido intersticial de modelos de ratones transgénicos de EA. La carga de amiloide A β en pacientes que tomaban medicamentos antidepresivos (que incluyen, pero no se limitan a los ISRS) era menor que en personas no tratadas. Tales conexiones entre los neurotransmisores y la patología de la EA pueden explicar por qué la depresión es un factor de riesgo significativo para la EA [101]. Los agonistas de varios receptores de serotonina también prometen reducir la neuroinflamación [102]. Por lo tanto, el tratamiento con ISRS y agonistas relevantes para reducir el amiloide A β y la neuroinflamación puede ser beneficioso para los pacientes con EA. La actividad de la serotonina puede ser relevante para el deterioro cognitivo observado en la EA y el deterioro cognitivo leve (DCL). De hecho, la pérdida neuronal típicamente observada en la EA afecta a regiones del cerebro con alta densidad de receptores de serotonina, como el hipocampo. Kepe *et al.* estudiaron la actividad del receptor de serotonina 1A en los cerebros de pacientes con EA; el equipo encontró que el potencial de unión 5-HT1A disminuyó significativamente en el hipocampo de pacientes con EA, junto con la pérdida de volumen característica de la región cerebral incluso en las etapas tempranas de la EA [103].

Aunque la disfunción del sistema dopaminérgico se ve más comúnmente afectada en la enfermedad de Parkinson (EP), hay evidencia de que el sistema es relevante o al menos se ve perturbado también en la EA [104]. En general, la dopamina y los receptores de dopamina están significativamente disminuidos en personas con EA en comparación con los controles [105], y la actividad de la enzima dopamina-beta-hidroxilasa, encargada de la conversión de dopamina, también está notablemente reducida [106]. Sin embargo, el grado de perturbación dopaminérgica no es necesariamente consistente en todos los casos de EA y es notablemente más significativo en casos en los que el paciente presenta apatía y signos extrapiramidales (similares a los de Parkinson). La transmisión de dopamina tiene muchas funciones relevantes para la EA. La dopamina está involucrada en múltiples

sistemas/mecanismos de función cognitiva y memoria [107,108]. Como parte del sistema de recompensa del cerebro, la dopamina es un componente crítico de la motivación y el aprendizaje por refuerzo [109-111]. La neuroinflamación y la activación de astrocitos y microglía, comúnmente observadas en casos de EA, se reducen mediante la dopamina [112-114]. Los medicamentos que tienen como objetivo la acetilcolina, uno de los pocos mecanismos de tratamiento sintomático actualmente en uso para la EA, aumentan la liberación de dopamina [115]. La dopamina también puede inhibir la formación de fibrillas y agregados de amiloide beta [116].

Con la aproximación computacional desarrollada en el proyecto se han encontrado fármacos que tienen un MoA ampliamente reconocido por la comunidad científica como una nueva estrategia para abordar la EA. La ventaja de algunos de estos fármacos es que están aprobados, es decir, se ha demostrado que no son tóxicos para el ser humano y que se reduciría el número de ensayos que se deberían de hacer para la nueva indicación de uso para el fármaco en cuestión.

El estudio de las distintas regiones cerebrales en relación con la enfermedad de Alzheimer es fundamental para comprender mejor la enfermedad, desarrollar tratamientos más efectivos y avanzar en la búsqueda de métodos de diagnóstico temprano. Comprender qué regiones cerebrales se ven más afectadas y en qué etapas de la enfermedad ayuda a identificar los marcadores tempranos de la enfermedad y desarrollar métodos de diagnóstico más precisos, así como saber los procesos patológicos subyacentes, es decir, determinar qué proceso está alterado o modificado en esa región. Esto a su vez puede orientar el desarrollo de tratamientos específicos que aborden las disfunciones en esas áreas particulares. En nuestro trabajo, se ha observado que, de los 76 fármacos que comprenden el listado de fármacos capaces de revertir el perfil de expresión génica de la EA, tan solo 4 coinciden entre el hipocampo y el córtex.

Además, es necesario destacar que la EA se comporta distinto teniendo en cuenta el sexo del paciente, por lo que es primordial tener en cuenta las diferencias que existen para poder proporcionar el mejor el tratamiento y asegurar una mayor tasa de éxito terapéutico.

Por todo ello, en el presente trabajo se proponen nuevos mecanismos de acción para hacer frente a la EA, haciendo hincapié en la importancia del dimorfismo sexual y en la región cerebral.

6. Conclusiones

1. El paquete SignatureSearch es una herramienta bioinformática que te permite realizar un estudio completo para identificar nuevas estrategias terapéuticas para una enfermedad, a partir del conjunto de datos que disponemos en nuestro trabajo.
2. El reposicionamiento de fármacos *in silico* basándose en el transcriptoma es una forma válida para realizar una selección entre multitud de fármacos de una manera computacional, proporcionando nuevas dianas terapéuticas para los fármacos, pudiendo tener en cuenta la variable sexo para la EA.
3. En los resultados obtenidos en el proyecto, los inhibidores de HDAC son identificados solamente en el caso de los hombres, lo que proporciona más evidencias de que la variable sexo debe ser tomada en cuenta a la hora de desarrollar fármacos.
4. Se observan diferencias en los fármacos obtenidos para las regiones cerebrales, identificándose 4 que coinciden tanto para el córtex como para el hipocampo.
5. Si observamos los resultados con la variable sexo, en el caso del hipocampo se observa que las diferencias por sexo son más notorias que en el córtex, puesto que en esta región sí que existen 4 fármacos que coinciden tanto para los hombres como para las mujeres mientras que en la otra no coincide ningún fármaco.
6. Con el estudio de la reversión por región cerebral se ha conseguido identificar fármacos con un MOA más específico para la región considerada en nuestro trabajo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] BLOOM, George S. Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA neurology*, 2014, vol. 71, no 4, p. 505-508.
- [2] ZHANG, Yun-wu, et al. APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular brain*, 2011, vol. 4, p. 1-13.
- [3] GAO, Yong-Lei, et al. Tau in neurodegenerative disease. *Annals of translational medicine*, 2018, vol. 6, no 10.
- [4] LENG, Fangda; EDISON, Paul. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?. *Nature Reviews Neurology*, 2021, vol. 17, no 3, p. 157-172.
- [5] BREIJYEH, Zeinab; KARAMAN, Rafik. Comprehensive review on Alzheimer's disease: Causes and treatment. *Molecules*, 2020, vol. 25, no 24, p. 5789.
- [6] LIU, Pei-Pei, et al. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal transduction and targeted therapy*, 2019, vol. 4, no 1, p. 29.
- [7] KARRAN, Eric; DE STROOPER, Bart. The amyloid hypothesis in Alzheimer disease: new insights from new therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2022, vol. 21, no 4, p. 306-318.
- [8] <https://www.alz.org/alzheimer-demencia/datos-y-cifras>
- [9] SATIZABAL, Claudia L., et al. Incidence of dementia over three decades in the Framingham Heart Study. *New England Journal of Medicine*, 2016, vol. 374, no 6, p. 523-532.
- [10] SIRKIS, Daniel W., et al. Dissecting the clinical heterogeneity of early-onset Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry*, 2022, vol. 27, no 6, p. 2674-2688.
- [11] EPPERLY, Ted; DUNAY, Megan A.; BOICE, Jack L. Alzheimer disease: pharmacologic and nonpharmacologic therapies for cognitive and functional symptoms. *American family physician*, 2017, vol. 95, no 12, p. 771-778.
- [12] BELLENGUEZ, Céline, et al. New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nature genetics*, 2022, vol. 54, no 4, p. 412-436.
- [13] LIM, Yen Ying, et al. APOE genotype and early β -amyloid accumulation in older adults without dementia. *Neurology*, 2017, vol. 89, no 10, p. 1028-1034.
- [14] LANE, Christopher A.; HARDY, John; SCHOTT, Jonathan M. Alzheimer's disease. *European journal of neurology*, 2018, vol. 25, no 1, p. 59-70.
- [15] LITKE, Rachel, et al. Modifiable risk factors in Alzheimer disease and related dementias: a review. *Clinical therapeutics*, 2021, vol. 43, no 6, p. 953-965.
- [16] YIANNPOULOU, Konstantina G.; PAPAGEORGIOU, Sokratis G. Current and future treatments in Alzheimer disease: an update. *Journal of central nervous system disease*, 2020, vol. 12, p. 1179573520907397.
- [17] YIANNPOULOU, Konstantina G., et al. Reasons for failed trials of disease-modifying treatments for Alzheimer disease and their contribution in recent research. *Biomedicines*, 2019, vol. 7, no 4, p. 97.
- [18] KIM, C. Kwon, et al. Alzheimer's disease: Key insights from two decades of clinical trial failures. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2022, vol. 87, no 1, p. 83-100.
- [19] GOLDE, Todd E. Alzheimer's disease—the journey of a healthy brain into organ failure. *Molecular Neurodegeneration*, 2022, vol. 17, no 1, p. 18.
- [20] PANZA, Francesco, et al. A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 2019, vol. 15, no 2, p. 73-88.

- [21] FANG, Jiansong, et al. Harnessing endophenotypes and network medicine for Alzheimer's drug repurposing. *Medicinal research reviews*, 2020, vol. 40, no 6, p. 2386-2426.
- [22] CUMMINGS, Jeffrey, et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2022. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 2022, vol. 8, no 1, p. e12295.
- [23] SUN, Duxin, et al. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it?. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2022, vol. 12, no 7, p. 3049-3062.
- [24] HINGORANI, Aroon D., et al. Improving the odds of drug development success through human genomics: modelling study. *Scientific reports*, 2019, vol. 9, no 1, p. 18911.
- [25] CHONG, Curtis R.; SULLIVAN JR, David J. New uses for old drugs. *Nature*, 2007, vol. 448, no 7154, p. 645-646.
- [26] LANGEDIJK, Joris, et al. Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug discovery today*, 2015, vol. 20, no 8, p. 1027-1034.
- [27] GHOFrani, Hossein A.; OSTERLOH, Ian H.; GRIMMINGER, Friedrich. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nature reviews Drug discovery*, 2006, vol. 5, no 8, p. 689-702.
- [28] PATRONO, Carlo, et al. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *New England Journal of Medicine*, 2005, vol. 353, no 22, p. 2373-2383.
- [29] LAFFITTE, Emmanuel; REVUZ, Jean. Thalidomide: an old drug with new clinical applications. *Expert opinion on drug safety*, 2004, vol. 3, no 1, p. 47-56.
- [30] TRIVEDI, Jay; MOHAN, Mahesh; BYRAREDDY, Siddappa N. Drug repurposing approaches to combating viral infections. *Journal of clinical medicine*, 2020, vol. 9, no 11, p. 3777.
- [31] PUSHPAKOM, Sudeep, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature reviews Drug discovery*, 2019, vol. 18, no 1, p. 41-58..
- [32] Sireau N (2013). *Rare Diseases. Challenges and Opportunities for Social Entrepreneurs*. 1 st. edn. Greenleaf Publishing Limited: United Kingdom.
- [33] CARTA, Anna R. PPAR- γ : therapeutic prospects in Parkinson's disease. *Current drug targets*, 2013, vol. 14, no 7, p. 743-751.
- [34] GAO, Xiang, et al. Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology*, 2011, vol. 76, no 10, p. 863-869.
- [35] SWEENEY, Danielle D.; CHANCELLOR, Michael B. Treatment of stress urinary incontinence with duloxetine hydrochloride. *Reviews in urology*, 2005, vol. 7, no 2, p. 81.
- [36] BELLERA, Carolina Leticia. *Búsqueda racional de nuevos fármacos antichagásicos inhibidores de la cruzipaña*. 2014. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- [37] PUSHPAKOM, Sudeep, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature reviews Drug discovery*, 2019, vol. 18, no 1, p. 41-58.
- [38] BROWN, Adam S.; PATEL, Chirag J. A review of validation strategies for computational drug repositioning. *Briefings in bioinformatics*, 2018, vol. 19, no 1, p. 174-177.
- [39] HODOS, Rachel A., et al. Computational approaches to drug repurposing and pharmacology. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 2016, vol. 8, no 3, p. 186.
- [40] GALINDEZ, Gihanna, et al. Lessons from the COVID-19 pandemic for advancing computational drug repurposing strategies. *Nature Computational Science*, 2021, vol. 1, no 1, p. 33-41.
- [41] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). "Se inicia el piloto europeo para impulsar el reposicionamiento de medicamentos autorizados".

- <https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/medicamentosusohumano-3/2021-medicamentosusohumano-3/se-inicia-el-piloto-europeo-para-impulsar-el-reposicionamiento-de-medicamentos-autorizados/>. Último acceso: 20 de septiembre de 2023.
- [42] HUGHES, Timothy R., et al. Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell*, 2000, vol. 102, no 1, p. 109-126.
- [43] LAMB, Justin, et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *science*, 2006, vol. 313, no 5795, p. 1929-1935.
- [44] SAMART, Kewalin, et al. Reconciling multiple connectivity scores for drug repurposing. *Briefings in Bioinformatics*, 2021, vol. 22, no 6, p. bbab161.
- [45]. MUSA, Aliyu, et al. A review of connectivity map and computational approaches in pharmacogenomics. *Briefings in bioinformatics*, 2018, vol. 19, no 3, p. 506-523.
- [46]. IORIO, Francesco, et al. Transcriptional data: a new gateway to drug repositioning?. *Drug discovery today*, 2013, vol. 18, no 7-8, p. 350-357.
- [47]. ANTONLIN, Albert, et al. Polypharmacology in precision oncology: current applications and future prospects. *Current pharmaceutical design*, 2016, vol. 22, no 46, p. 6935-6945.
- [48]. KOUDIJS, Karel KM, et al. Personalised drug repositioning for Clear Cell Renal Cell Carcinoma using gene expression. *Scientific reports*, 2018, vol. 8, no 1, p. 5250.
- [49]. YANG, Chen, et al. A survey of optimal strategy for signature-based drug repositioning and an application to liver cancer. *Elife*, 2022, vol. 11, p. e71880.
- [50]. SIROTA, Marina, et al. Discovery and preclinical validation of drug indications using compendia of public gene expression data. *Science translational medicine*, 2011, vol. 3, no 96, p. 96ra77-96ra77.
- [51]. YUEN, Tony, et al. Disease-drug pairs revealed by computational genomic connectivity mapping on GBA1 deficient, Gaucher disease mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 2012, vol. 422, no 4, p. 573-577.
- [52]. ZHANG, Lu, et al. Connectivity mapping identifies BI-2536 as a potential drug to treat diabetic kidney disease. *Diabetes*, 2021, vol. 70, no 2, p. 589-602.
- [53]. DOTOLO, Serena, et al. A review on drug repurposing applicable to COVID-19. *Briefings in bioinformatics*, 2021, vol. 22, no 2, p. 726-741.
- [54]. TAUBES, Alice, et al. Experimental and real-world evidence supporting the computational repurposing of bumetanide for APOE4-related Alzheimer's disease. *Nature Aging*, 2021, vol. 1, no 10, p. 932-947.
- [55]. PAULS, Eduardo, et al. Identification and drug-induced reversion of molecular signatures of Alzheimer's disease onset and progression in AppNL-GF, AppNL-F, and 3xTg-AD mouse models. *Genome Medicine*, 2021, vol. 13, no 1, p. 1-23.
- [56] TORO, Carlos A., et al. Sex differences in Alzheimer's disease: Understanding the molecular impact. *Brain research*, 2019, vol. 1719, p. 194-207.
- [57] Ferretti MA, Santuccione A, Schumacher A, Iulita MF, Martinkova J, Campo L, Hampel H. Optimal Alzheimer's disease detection and diagnosis under the sex and gender lens: a crucial step towards precision neurology. Chapter 20: Sex, gender and cultural factors. *World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia*. London, England: Alzheimer's Disease International
- [58] COLLINS, Francis S.; VARMUS, Harold. A new initiative on precision medicine. *New England journal of medicine*, 2015, vol. 372, no 9, p. 793-795.
- [59] FERRETTI, Maria Teresa, et al. Sex differences in Alzheimer disease—the gateway to precision medicine. *Nature Reviews Neurology*, 2018, vol. 14, no 8, p. 457-469.
- [60] GUO, Lei, et al. Sex differences in Alzheimer's disease: Insights from the multiomics landscape. *Biological psychiatry*, 2022, vol. 91, no 1, p. 61-71.

- [61] KHRAMTSOVA, Ekaterina A.; DAVIS, Lea K.; STRANGER, Barbara E. The role of sex in the genomics of human complex traits. *Nature Reviews Genetics*, 2019, vol. 20, no 3, p. 173-190.
- [62] SCHWARTZ, Janice B.; WEINTRAUB, Sandra. Treatment for alzheimer disease—sex and gender effects need to be explicitly analyzed and reported in clinical trials. *JAMA network open*, 2021, vol. 4, no 9, p. e2124386-e2124386.
- [63] FISHER, Jennifer L., et al. Considerations and challenges for sex-aware drug repurposing. *Biology of sex Differences*, 2022, vol. 13, no 1, p. 13.
- [64]
https://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/signatureSearch/inst/doc/signatureSearch.html#1_Introduction Visitado por última vez 30 de septiembre de 2023
- [65] DUAN, Yuzhu, et al. signatureSearch: environment for gene expression signature searching and functional interpretation. *Nucleic acids research*, 2020, vol. 48, no 21, p. e124-e124.
- [66] SUBRAMANIAN, Aravind, et al. A next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1,000,000 profiles. *Cell*, 2017, vol. 171, no 6, p. 1437-1452. e17.
- [67] EDGAR, Ron; DOMRACHEV, Michael; LASH, Alex E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic acids research*, 2002, vol. 30, no 1, p. 207-210.
- [68] PECK, David, et al. A method for high-throughput gene expression signature analysis. *Genome biology*, 2006, vol. 7, p. 1-6.
- [69] WISHART, David S., et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic acids research*, 2018, vol. 46, no D1, p. D1074-D1082.
- [70] GAULTON, Anna, et al. The ChEMBL database in 2017. *Nucleic acids research*, 2017, vol. 45, no D1, p. D945-D954.
- [71] KUHN, Michael, et al. STITCH 2: an interaction network database for small molecules and proteins. *Nucleic acids research*, 2010, vol. 38, no suppl_1, p. D552-D556.
- [72] SUBRAMANIAN, Aravind, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, vol. 102, no 43, p. 15545-15550.
- [73] FANG, Zhaoyuan; TIAN, Weidong; JI, Hongbin. A network-based gene-weighting approach for pathway analysis. *Cell research*, 2012, vol. 22, no 3, p. 565-580.
- [74] BENJAMINI, Yoav; HOCHBERG, Yosef. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*, 1995, vol. 57, no 1, p. 289-300.
- [75] ROSELLI, Charles E. Neurobiology of gender identity and sexual orientation. *Journal of neuroendocrinology*, 2018, vol. 30, no 7, p. e12562.
- [76] KHAN, Asra Nasir, et al. Anti-tuberculosic thionamide antibiotics show antioxidative and neuronal cytoprotective nature by inhibiting amyloid formation in human insulin and amyloid β -42. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, vol. 326, p. 115396.
- [77] RYDER, John; SU, Yuan; NI, Binhui. Akt/GSK3 β serine/threonine kinases: evidence for a signalling pathway mediated by familial Alzheimer's disease mutations. *Cellular signalling*, 2004, vol. 16, no 2, p. 187-200.
- [78] HORIKE, Nanao, et al. AMP-activated protein kinase activation increases phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β and thereby reduces cAMP-responsive element transcriptional activity and phosphoenolpyruvate carboxykinase C gene expression in the liver. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, vol. 283, no 49, p. 33902-33910.

- [79] LEE, Soo Youn, et al. A proteotranscriptomic-based computational drug-repositioning method for Alzheimer's disease. *Frontiers in pharmacology*, 2020, vol. 10, p. 1653.
- [80] MUTTI, Veronica, et al. LRRK2 Kinase Inhibition Attenuates Neuroinflammation and Cytotoxicity in Animal Models of Alzheimer's and Parkinson's Disease-Related Neuroinflammation. *Cells*, 2023, vol. 12, no 13, p. 1799.
- [81] SOARES ROMEIRO, Luiz Antonio, et al. Novel sustainable-by-design HDAC inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2019, vol. 10, no 4, p. 671-676.
- [82] CLAEYSEN, Sylvie; BOCKAERT, Joël; GIANNONI, Patrizia. Serotonin: a new hope in Alzheimer's disease?. *ACS chemical neuroscience*, 2015, vol. 6, no 7, p. 940-943.
- [83] KISLER, Cassandra, et al. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 2017, vol. 18, no 7, p. 419-434.
- [84] BAHADO-SINGH, Ray O., et al. Alzheimer's Precision Neurology: Epigenetics of Cytochrome P450 Genes in Circulating Cell-Free DNA for Disease Prediction and Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, no 3, p. 2876.
- [85] CIRRITO, John R., et al. Serotonin signaling is associated with lower amyloid- β levels and plaques in transgenic mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, vol. 108, no 36, p. 14968-14973.
- [86] TOWNSEND, David J., et al. Circular dichroism spectroscopy identifies the β -adrenoceptor agonist salbutamol as a direct inhibitor of tau filament formation in vitro. *ACS chemical neuroscience*, 2020, vol. 11, no 14, p. 2104-2116.
- [87] WANG, Ying, et al. Maresin 1 attenuates pro-inflammatory activation induced by β -amyloid and stimulates its uptake. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, vol. 25, no 1, p. 434-447.
- [88] WANG, Chunyu, et al. Estrogen receptor- α is localized to neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Scientific reports*, 2016, vol. 6, no 1, p. 20352.
- [89] DANTA, Chhanda Charan. Calcium channel blockers: a possible potential therapeutic strategy for the treatment of Alzheimer's dementia patients with SARS-CoV-2 infection. *ACS Chemical Neuroscience*, 2020, vol. 11, no 15, p. 2145-2148.
- [90] KEHOE, Patrick G.; MINERS, Scott; LOVE, Seth. Angiotensins in Alzheimer's disease—friend or foe?. *Trends in neurosciences*, 2009, vol. 32, no 12, p. 619-628.
- [91] WRIGHT, John W.; HARDING, Joseph W. The brain RAS and Alzheimer's disease. *Experimental neurology*, 2010, vol. 223, no 2, p. 326-333.
- [92] KEHOE, Patrick Gavin, et al. Angiotensin-III is increased in Alzheimer's disease in association with amyloid- β and tau pathology. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2017, vol. 58, no 1, p. 203-214.
- [93] KEHOE, Patrick Gavin, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is reduced in Alzheimer's disease in association with increasing amyloid- β and tau pathology. *Alzheimer's research & therapy*, 2016, vol. 8, p. 1-10.
- [94] YASAR, Sevil, et al. Angiotensin II blood levels are associated with smaller hippocampal and cortical volumes in cognitively normal older adults. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2020, vol. 75, no 2, p. 521-529.
- [95] SHAFI, Ovais. Inverse relationship between Alzheimer's disease and cancer, and other factors contributing to Alzheimer's disease: a systematic review. *BMC neurology*, 2016, vol. 16, no 1, p. 1-17.
- [96] GILBERT, Tonya M., et al. Neuroepigenetic signatures of age and sex in the living human brain. *Nature communications*, 2019, vol. 10, no 1, p. 2945.

- [97] NIKOLAC PERKOVIC, Matea, et al. Epigenetics of Alzheimer's disease. *Biomolecules*, 2021, vol. 11, no 2, p. 195.
- [98] TYLER, Christina R. Steadman, et al. Sex-dependent effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium valproate, on reversal learning after developmental arsenic exposure. *Frontiers in Genetics*, 2018, vol. 9, p. 200.
- [99] BANKOLE, Oluwamolakun, et al. Beneficial and sexually dimorphic response to combined HDAC inhibitor valproate and AMPK/SIRT1 pathway activator resveratrol in the treatment of ALS mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, vol. 23, no 3, p. 1047.
- [100] PILOZZI, Alexander, et al. A Brief Review on the Potential of Psychedelics for Treating Alzheimer's Disease and Related Depression. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, no 15, p. 12513.
- [101] CIRRITO, John R., et al. Serotonin signaling is associated with lower amyloid- β levels and plaques in transgenic mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, vol. 108, no 36, p. 14968-14973.
- [102] CLAEYSEN, Sylvie; BOCKAERT, Joël; GIANNONI, Patrizia. Serotonin: a new hope in Alzheimer's disease?. *ACS chemical neuroscience*, 2015, vol. 6, no 7, p. 940-943.
- [103] KEPE, Vladimir, et al. Serotonin 1A receptors in the living brain of Alzheimer's disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, vol. 103, no 3, p. 702-707.
- [104] LOTHARIUS, Julie; BRUNDIN, Patrik. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nature Reviews Neuroscience*, 2002, vol. 3, no 12, p. 932-942.
- [105] PAN, Xiongfeng, et al. Dopamine and dopamine receptors in Alzheimer's disease: A systematic review and network meta-analysis. *Frontiers in aging neuroscience*, 2019, vol. 11, p. 175.
- [106] CROSS, Alan J., et al. Reduced dopamine-beta-hydroxylase activity in Alzheimer's disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1981, vol. 282, no 6258, p. 93-94.
- [107] NIEOULLON, André. Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Progress in neurobiology*, 2002, vol. 67, no 1, p. 53-83.
- [108] GOLDMAN-RAKIC, Patricia S. The cortical dopamine system: role in memory and cognition. *Advances in pharmacology*, 1997, vol. 42, p. 707-711.
- [109] WISE, Roy A. Dopamine, learning and motivation. *Nature reviews neuroscience*, 2004, vol. 5, no 6, p. 483-494.
- [110] EISENEGGER, Christoph, et al. Role of dopamine D2 receptors in human reinforcement learning. *Neuropsychopharmacology*, 2014, vol. 39, no 10, p. 2366-2375.
- [111] SHINER, Tamara, et al. Dopamine and performance in a reinforcement learning task: evidence from Parkinson's disease. *Brain*, 2012, vol. 135, no 6, p. 1871-1883.
- [112] XIA, Qing-Peng; CHENG, Zhao-Yan; HE, Ling. The modulatory role of dopamine receptors in brain neuroinflammation. *International Immunopharmacology*, 2019, vol. 76, p. 105908.
- [113] SHAO, Ling-Xiao, et al. Psilocybin induces rapid and persistent growth of dendritic spines in frontal cortex in vivo. *Neuron*, 2021, vol. 109, no 16, p. 2535-2544. e4.
- [114] GAO, Hui-Ming, et al. Neuroinflammation and oxidation/nitration of α -synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, 2008, vol. 28, no 30, p. 7687-7698.

[115] ZHANG, Lifen; ZHOU, Fu-Ming; DANI, John A. Cholinergic drugs for Alzheimer's disease enhance in vitro dopamine release. *Molecular pharmacology*, 2004, vol. 66, no 3, p. 538-544.

[116] LI, J. I. E., et al. Dopamine and L-dopa disaggregate amyloid fibrils: implications for Parkinson's and Alzheimer's disease. *The FASEB journal*, 2004, vol. 18, no 9, p. 962-964.

8. Índice de tablas

Tabla 1. Ejemplos de fármacos reposicionados. Se muestra el nombre genérico del fármaco, la indicación original, la nueva indicación y la referencia bibliográfica. Tabla adaptada de (Bellera, 2014-[36]).	13
Tabla 2. Diferencias de sexo en pacientes con EA basada en indicadores epidemiológicos y clínicos. LCF: Líquido Cefalorraquídeo; TEP: Tomografía por Emisión de Positrones; DCL: Deterioro Cognitivo Leve.	16
Tabla 3. Definición de la firma de genes de enfermedad por sexo y región cerebral: CT: córtex; HP: hipocampo; GS: genes diferencialmente expresados de manera significativa (FDR<0.05); GS up:sobreexpresados; GS down: infraexpresados.	27
Tabla 4. Propiedades farmacológicas de los fármacos identificados en mujeres a partir de los perfiles de expresión del CT.	28
Tabla 5. Propiedades farmacológicas de los fármacos identificados en hombres a partir de los perfiles de expresión del CT	30
Tabla 6. Propiedades farmacológicas de los fármacos identificados en mujeres a partir de los perfiles de expresión del HP.	36
Tabla 7. Propiedades farmacológicas de los fármacos identificados en hombres a partir de los perfiles de expresión del HP.	38
Tabla 8. Sumatorio de fármacos. CT: córtex; HP: hipocampo;	41
Tabla 9. Sumatorio de fármacos. CT: córtex; HP: hipocampo; M: mujer; H: hombre.	41

9. Índice de Figuras

Figura 1. La estructura fisiológica del cerebro y las neuronas en a) cerebro sano, b) cerebro con EA [5].	6
Figura 2. Resumen de los genes implicados hasta la fecha en la EA. Cuando hay dos colores internos, el gen está implicado en más de una vía. Los genes marcados con un círculo amarillo también influyen en el metabolismo de la proteína precursora del amiloide; los marcados con un círculo rojo influyen en el metabolismo de la proteína tau [14]	8
Figura 3. Proceso de desarrollo y evaluación de fármacos de novo versus reposicionamiento.	12
Figura 4. Principio de reversión del transcriptoma en el RF. Adaptada de Lamb y col.	15
Figura 5. Flujo de trabajo de signatureSearch. Se indican los métodos GESS y de enriquecimiento implementados en el mismo paquete.	19
Figura 6. Diseño del paquete con respecto a sus contenedores de datos y métodos utilizados por los pasos individuales del flujo de trabajo de búsqueda de firmas.	20
Figura 7. Enriquecimiento funcional basado en la ontología de proceso biológico de la GO en el CT, a)mujeres, b)hombres.	33
Figura 8. Enriquecimiento funcional basado en las rutas KEGG en el CT, a) mujeres, b) hombres.	34
Figura 9. Enriquecimiento funcional basado en las rutas REACTOME en el CT, a) mujeres, b) hombres.	35
Figura 10. Enriquecimiento funcional basado en la ontología de proceso biológico de la GO en el HP, a) mujeres, b) hombres.	39
Figura 11. Enriquecimiento funcional basado en las rutas KEGG en el HP, a)mujeres b)hombres.	40
Figura 12. Enriquecimiento funcional basado en las rutas REACTOME en el HP, a)mujeres b)hombres.	40