

TESINA DE GRADO

Estudio de la biestabilidad en
modelos metabólicos y de
señalización:
el caso de la Apoptosis

Alejandra Rojas López

Tutor: Dr. Luis Acerenza

Laboratorio de Biología de Sistemas.

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Noviembre 2016

Índice

Resumen.....	3
1. Introducción	
1.1. Análisis sistémico de fenómenos bioquímicos.....	4
1.2. Biestabilidad.....	4
1.3. Apoptosis	
1.3.1 Generalidades.....	8
1.3.2. Modelos matemáticos.....	12
2. Materiales y métodos	
2.1. Herramientas matemáticas.....	14
2.2. Modelos.....	15
3. Resultados y discusión	
3.1. Modelo metabólico de prueba.....	18
3.2. Modelos de apoptosis	
3.2.1. Modelo de la vía intrínseca (Legewie et al.).....	21
3.2.2. Modelo reducido de la vía intrínseca.....	24
3.2.3. Modelo de la vía extrínseca (Eissing et al.).....	28
3.2.4. Modelo reducido de la vía extrínseca.....	29
3.2.5. Combinación de los modelos reducidos de la vía intrínseca y extrínseca.....	34
4. Conclusiones.....	37
5. Bibliografía.....	38

Resumen

En el presente trabajo se estudia la biestabilidad en sistemas bioquímicos. El primer objetivo del estudio es determinar, para un modelo dado, si presenta una estructura compatible con la biestabilidad. Por ejemplo, si presenta feedback positivos, que son potenciales generadores de comportamiento biestable. Al llegar a la conclusión de que la estructura puede presentar biestabilidad, se busca un conjunto de leyes de velocidad y parámetros para los cuales se verifique dicho comportamiento. En particular, se estudió el fenómeno de apoptosis, uno de los mecanismos de muerte celular programada. Es el mecanismo de muerte celular más estudiado en la actualidad y se basa en la respuesta celular a estímulos de muerte que pueden ser internos o externos. En respuesta a los mismos, la célula puede desencadenar una cascada de proteasas, llamadas caspasas, que termina con la degradación de los componentes celulares, la formación de cuerpos apoptóticos y la eliminación de los mismos de los tejidos. Para estudiar este fenómeno se emplearon dos modelos de activación de la apoptosis, uno de la vía intrínseca [34] y otro de vía extrínseca [33] obtenidos de la bibliografía. Primeramente, se verificó que los modelos utilizados para ambas vías de activación, presentan biestabilidad con las leyes de velocidad y parámetros reportados. Luego, se redujo el modelo de la vía intrínseca, eliminando al inhibidor de la apoptosis XIAP para estudiar su comportamiento en ausencia del doble feedback negativo causado por XIAP. En este caso, no se encontró biestabilidad para ninguna de las combinaciones de leyes de velocidad y parámetros utilizados, a pesar de que el modelo de vía intrínseca reducido presenta cuatro feedback positivos. Similarmente, el modelo de la vía extrínseca no es capaz de exhibir biestabilidad, si es reducido eliminando los inhibidores IAP y BAR. En cambio, si se incorporan algunas modificaciones en las leyes de velocidad que incrementan su no linealidad reaparece la biestabilidad aún en ausencia de IAP y BAR. Finalmente, se combinaron los modelos reducidos de la vía intrínseca y extrínseca. Si se mantienen las leyes de velocidad reportadas, el modelo combinado no presenta biestabilidad. Sin embargo, si en la vía extrínseca se incorporan las no linealidades mencionadas, la biestabilidad se mantiene en el modelo combinado. Estos resultados sugieren que para obtener comportamientos biestables en el fenómeno de apoptosis se requiere no solamente los feedback positivos, que son normalmente condición necesaria, sino además la presencia de inhibidores que permiten que efectivamente aparezcan dos estados estacionarios estables.

Palabras clave: apoptosis, biestabilidad, biología de sistemas.

Introducción

1.1. Análisis sistémico de fenómenos bioquímicos

El estudio de muchos fenómenos o el abordaje de distintos problemas tanto dentro de la bioquímica como en otros campos de la ciencia requiere enfoques globales que consideren la totalidad de los componentes del sistema y no sólo los que se presume son importantes para estudiar lo que se pretende estudiar. Así por ejemplo la biología de sistemas ha desarrollado métodos para el análisis sistémico basado en herramientas computacionales y matemáticas en el estudio de fenómenos como la apoptosis [1], diferenciación celular, cambios metabólicos en las poblaciones bacterianas [2], así como el metabolismo de distintos organismos [3].

Considerando la descripción a través de ecuaciones diferenciales, la complejidad de los problemas biológicos y la cantidad de interacciones no lineales que hay en los mismos, en general no es posible hallar soluciones analíticas para los sistemas (en un sistema bioquímico, no se logra encontrar una función que describa la variación de cada metabolito en el tiempo). Pueden utilizarse métodos de cálculo numérico, pero estos a veces no son computacionalmente viables cuando los sistemas se complejizan, además de que la cantidad de parámetros que deben medirse, calcularse o estimarse aumenta considerablemente [4]. Asimismo, en la mayoría, de los modelos se considera a la célula como un reactor bien agitado, donde no se toman en cuenta efectos de difusión, a pesar de que se sabe que la separación espacial y la compartimentalización son importantes mecanismos de regulación [5].

Así, una buena aproximación para estudiar ciertas características de un sistema bioquímico es estudiar las soluciones del sistema en estado estacionario. En estas condiciones se considera que las concentraciones de los metabolitos no varían en el tiempo, lo que permite determinar el flujo a través de las vías o redes y así conocer su funcionamiento. Un sistema dinámico puede clasificarse en función de la cantidad de estados estacionarios que tiene. A su vez los estados pueden clasificarse en estables o inestables [6]. Cualitativamente, un estado estacionario es estable cuando las trayectorias vecinas se aproximan asintóticamente al mismo e inestable cuando las trayectorias vecinas se alejan del mismo. Entonces un sistema multiestable tiene varios estados estacionarios estables y en particular un sistema es considerado biestable cuando posee dos estados estacionarios estables.

1.2. Biestabilidad

Se ha observado en diversos mecanismos biológicos la existencia de biestabilidad. Un ejemplo es la vía de señalización Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) [7], esquematizada en la Figura 1, que ha sido intensamente estudiada por su amplia distribución a nivel celular. La vía MAPK consiste en

una cascada de fosforilación, en general en tres niveles, que permiten la señalización de estímulos externos para modificar el metabolismo y eventualmente llevar la señal al núcleo y modificar la expresión génica [8]. Este mecanismo se utiliza en distintos contextos, como señalar proliferación celular en respuesta a factores de crecimiento. La vía de MAPK ha demostrado tener comportamiento ultrasensible (respuesta tipo interruptor, "switch-like") [9]. Además, la estructura que la representa posee la capacidad de presentar comportamiento oscilatorio y biestabilidad, o sea, de tener dos estados de funcionamiento posibles, uno donde el sistema está en reposo y otro donde se activa la cascada de señalización [10].

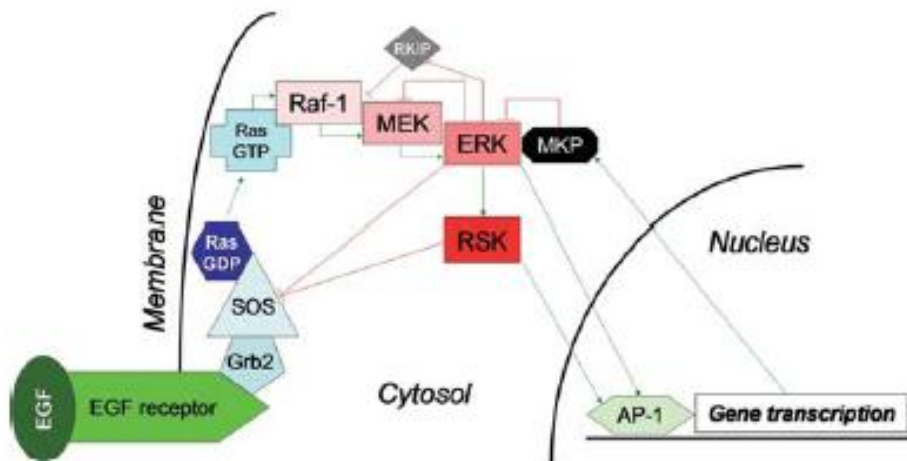


Figura 1: Esquema de la activación de la cascada MAPK en respuesta al factor de crecimiento EGF. Se puede observar como la señal se traslada hasta el núcleo donde modifica la expresión génica. Las conexiones de color verde corresponden a interacciones activadoras y las rojas a inhibidoras. [7]

También se observa biestabilidad en vías metabólicas. Un ejemplo es la glicolisis donde se ha mostrado que presenta dos estados estables, uno de alto flujo y otro de bajo flujo (ver Figura 2) en relación a la producción de energía de manera aeróbica [11] y anaeróbica [12]. Se ha relacionado estos dos modos de funcionamiento de la glicolisis con las necesidades energéticas de la célula. Por ejemplo, cuando la célula está proliferando presenta un alto flujo a través de la vía. [3] También se ha utilizado el análisis de estabilidad para estudiar el efecto Warburg (aumento de flujo de la glicolisis cuando la vía produce lactato a partir de piruvato en lugar de continuar su oxidación en la mitocondria) en el consumo de glucosa obteniéndose buenos resultados [12].

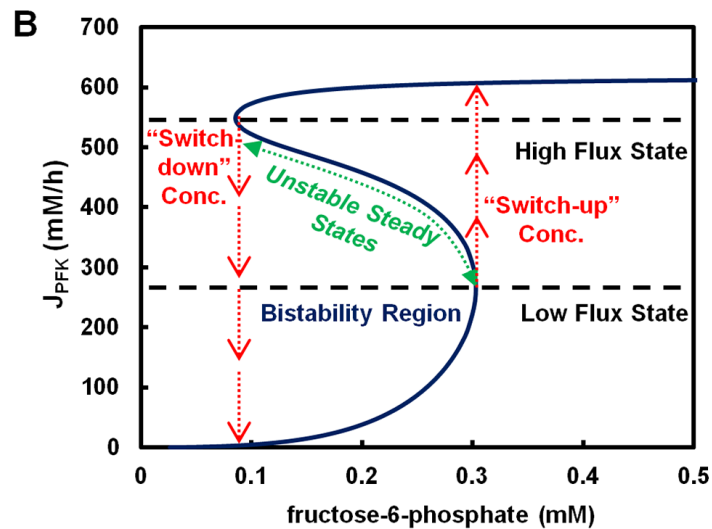


Figura 2: Esquema que muestra el comportamiento biestable del flujo en la vía glicolítica. Se puede apreciar que presenta dos modos de funcionamiento posible, de alto y bajo flujo, separados por un estado de transición. Se observa que la condición para llegar y salir de cada uno de los estados es diferente. [11]

A su vez, con este tipo de estudio, se ha determinado que la falla en las rutas bioquímicas y biológicas, habitualmente asociadas con patologías, puede correlacionarse con el cambio en el comportamiento de los estados estacionarios del sistema, modificándose o desapareciendo. A modo de referencia, se ha estudiado como la desregulación de la vía Akt [3], estrechamente vinculada a las MAPK, que regula el funcionamiento de la glicólisis para adaptarlo a los requerimientos celulares se asocia a la excesiva proliferación celular y al cáncer.

La utilidad de estudiar la potencialidad de un sistema para ser multiestable, en particular biestable, reside en la posibilidad de entender los modos en los que opera el sistema, de qué manera responde en el momento en que recibe el estímulo, no lo hace cuando no debe hacerlo y cómo modula las características de la respuesta. Además, conocer los comportamientos dinámicos que es capaz de adoptar el sistema puede ayudar a entender las propiedades de respuesta que caracterizan a las redes biológicas, como la especificidad y robustez [13]. También se ha estudiado si existe alguna relación entre la estructura de las vías o redes y su capacidad de exhibir comportamiento biestable u otro comportamiento dinámico [14,15]. Se ha encontrado que determinadas estructuras son potenciales generadores de inestabilidad en los sistemas y de la posibilidad de que el sistema pueda acceder a más de un estado estacionario [6]. Los feedback positivos son estructuras desestabilizantes al igual que los dobles feedbacks negativos, habiéndose estudiado el rol de los mismos en la respuesta de distintas vías, desde el punto de vista matemático [15, 16].

Los sistemas son capaces de mostrar diferentes tipos de respuestas a estímulos además de biestabilidad, comenzando por Michaelis-Menten, donde la respuesta es saturable (Figura 3). También pueden presentar ultrasensibilidad, es decir la capacidad de que se genere un cambio drástico en la respuesta cuando se sobrepasa un determinado límite en la intensidad del estímulo o entrada [7]. La curva característica de esta respuesta es sigmoide y cuanto más pronunciada es la pendiente de la curva, cuando ocurre el cambio, más se parece a una respuesta de tipo interruptor. La respuesta de histéresis está estrechamente relacionada con la de biestabilidad, dado que los sistemas con dos estados estacionarios estables necesariamente exhiben histéresis. Esta puede entenderse como la capacidad del sistema de almacenar información de su estado anterior, dado que los caminos de ida y vuelta a un estado son diferentes (Figura 3). Cabe aclarar que existen formalismos matemáticos que describen el fenómeno de histéresis y pueden ser aplicados a diferentes tipos de sistemas, en particular los biológicos y bioquímicos. [17]

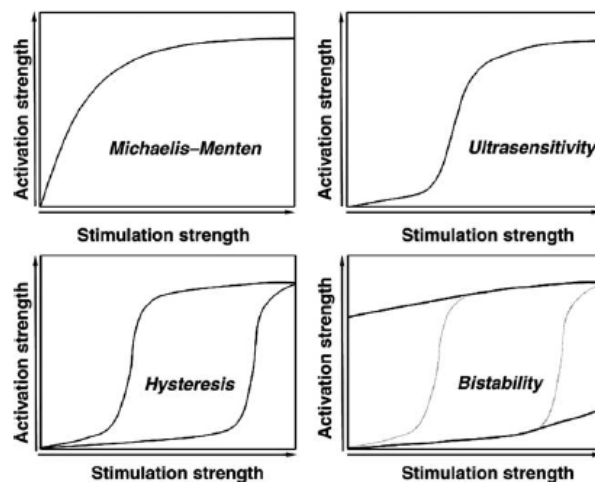


Figura 3: Diferentes comportamientos que pueden adoptar los sistemas dinámicos. Ver descripción en el texto. [7]

La búsqueda de biestabilidad en sistemas biológicos ha sido muy extendida en la actualidad, estudiándose desde mecanismos de diferenciación celular [18], modelos de desarrollo de organismos [19], vías de señalización celular [20, 21], redes de regulación de la expresión génica y variación de la misma en poblaciones celulares [2, 22].

Por ejemplo, en el trabajo de Ozbudak et al. [2], que estudia consumo de lactosa por parte de poblaciones bacterianas, se observa como la activación del operón *lac* encargado de regular el consumo de lactosa en bacterias presenta comportamiento biestable. Se analiza la influencia tanto de la entrada de lactosa, como la disponibilidad de glucosa que inhibe la activación del operón. En este caso se utiliza un abordaje teórico-experimental. Así, como se ve en la Figura 4, las distintas células en una población pueden encontrarse en dos estados diferentes, dependiendo de los niveles de expresión del operón. A

su vez se puede observar que existe un rango para la concentración extracelular de tiometilgalactósido (TMG, un inductor no metabolizable del operón *lac*.) para el cual el sistema se comporta de manera biestable. De esta manera las células pueden adaptar su expresión génica a las condiciones ambientales y los estados estacionarios a los que pueden acceder representan los fenotipos que pueden adoptar. Este comportamiento biestable se debe a la existencia de un feedback positivo ya que TMG activa su propia entrada a la célula.

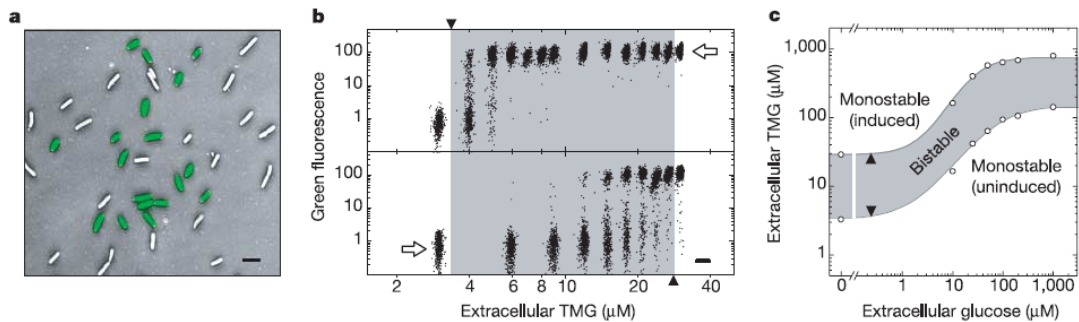


Figura 4: Se muestran algunos resultados del trabajo de Ozbudak et al. en el estudio de la biestabilidad en el consumo de lactosa para *E.coli*. a) Imagen de microscopía de contraste de fase superpuesta con fluorescencia, mostrando que hay células con alta (verdes) y baja (blancas) expresión del operón *lac*. b) Variación de la expresión de GFP para la población bacteriana en función de la concentración de TMG extracelular, muestra un comportamiento biestable. Las flechas en los paneles superior e inferior muestran el estado inicial de la población en cada caso. c) Esquemización del comportamiento del sistema dependiendo de las concentraciones de TMG y glucosa [2].

Finalmente, existen varios métodos de estudio de biestabilidad en redes de señalización, habiéndose analizado los sistemas tanto por ecuaciones diferenciales como por redes lógicas (donde los componentes tienen asignados reglas lógicas). Las redes estudiadas van desde cascadas de fosforilación, diferentes vías de transducción de señales [23] o cascadas de proteasas [24]. En particular, se ha estudiado la biestabilidad en el fenómeno biológico de apoptosis, dada su complejidad y relevancia fisiológica. Este es el tema que desarrollaremos a continuación.

1.3. Apoptosis

1.3.1. Generalidades

La apoptosis es el mecanismo de muerte celular programada más estudiado en la actualidad, aunque no el único (recientemente se han hecho avances en entender el funcionamiento de la necrosis y la autofagia) [25]. La apoptosis conceptualmente consiste en que una célula determinada ejecute un programa de muerte, en el cual degrada sus componentes, fragmenta el material genético, pero manteniendo la integridad de la membrana celular.

Entonces la célula se divide en cuerpos apoptóticos que son eliminados por fagocitos como los macrófagos sin causar inflamación de los tejidos [26].

La apoptosis puede ser activada principalmente por dos vías (ver Figura 5), la extrínseca que ocurre principalmente por señales de muerte extracelulares [27], por ejemplo, por interacción del ligando FAS con su receptor o estimulación por factor de necrosis tumoral (TNF), y la vía intrínseca que se da en respuesta a estrés celular, como el daño en el DNA y tiene como principal estímulo la pérdida de función mitocondrial y liberación del citocromo C [28].

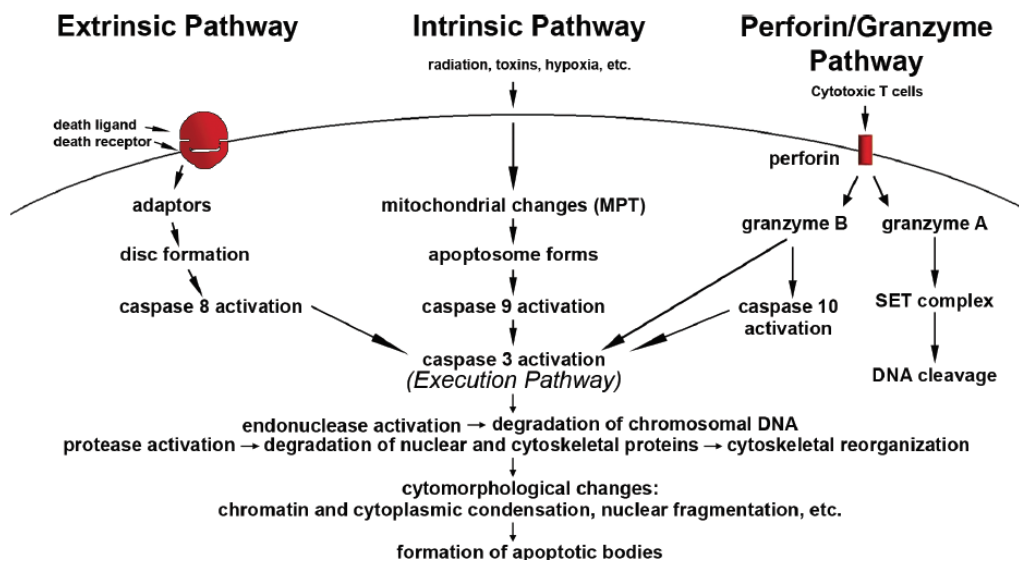


Figura 5: Breve resumen de las vías de activación de la apoptosis y los principales eventos que ocurren en cada una. [26]

Ambas vías están muy interconectadas pudiendo una estimular a la otra, además de compartir mecanismos efectores, es decir la forma en la cual ejecutan el programa de la muerte celular. Este proceso está basado en la activación de una cascada de proteasas, llamadas caspasas. Son una familia de cisteín-proteasas, de las cuales las más relevantes son la caspasa 9, estimulada en la vía intrínseca, la caspasa 8 de la vía extrínseca y la caspasa 3 que es la efectora en las dos vías, o sea la que efectivamente cliva proteolíticamente diferentes blancos celulares que promueven la degradación del contenido celular y la formación de los cuerpos apoptóticos. [30]

La apoptosis también puede ser desencadenada por inducción proveniente de células del sistema inmune. Esto se debe a que cuando una célula no funciona correctamente, por ejemplo, a causa de una infección viral o un daño en el DNA que cause transformación maligna celular, debe ser eliminada para evitar que se perjudique el resto del tejido. La inducción de la muerte puede ocurrir por interacción con ligandos de muerte o por liberación de gránulos citotóxicos por parte de linfocitos T CD8 citotóxicos y células NK cuyo contenido genera

poros en la membrana y desencadenan los procesos que estimulan la activación de las caspasas [29].

Debido a que la apoptosis es indispensable para mantener la homeostasis de los tejidos, evitando excesiva muerte celular que perjudique la funcionalidad, o la excesiva proliferación que también afecte la función o de lugar a la formación de tumores, este mecanismo está fuertemente regulado [26] (Figura 6). Existen distintas familias proteicas encargadas de la regulación de la apoptosis, clasificadas en pro- y anti-apoptóticas dependiendo de su influencia sobre la activación de la apoptosis. Por ejemplo, XIAP es uno de los principales inhibidores de la apoptosis, ya que se une a las caspasas 3 y 9 inactivándolas y promoviendo su degradación. Mientras Smac, es una proteína que frente a la pérdida de función mitocondrial es liberada al citosol uniéndose a XIAP evitando que se una a las caspasas, por lo tanto, es pro-apoptótica [29].

A su vez está la familia de proteínas reguladoras de la apoptosis Bcl2, que está compuesta por miembros que comparten homología de secuencia. Se sabe que esta familia presenta miembros tanto anti como pro-apoptóticos los cuales interaccionan con las proteínas Bax y Bak. Si se logra activar estas últimas, generan poros en la membrana de la mitocondria, liberando proteínas desencadenantes de la apoptosis, por ejemplo, el citocromo C que forma parte del apoptosoma, activador de la vía intrínseca [29].

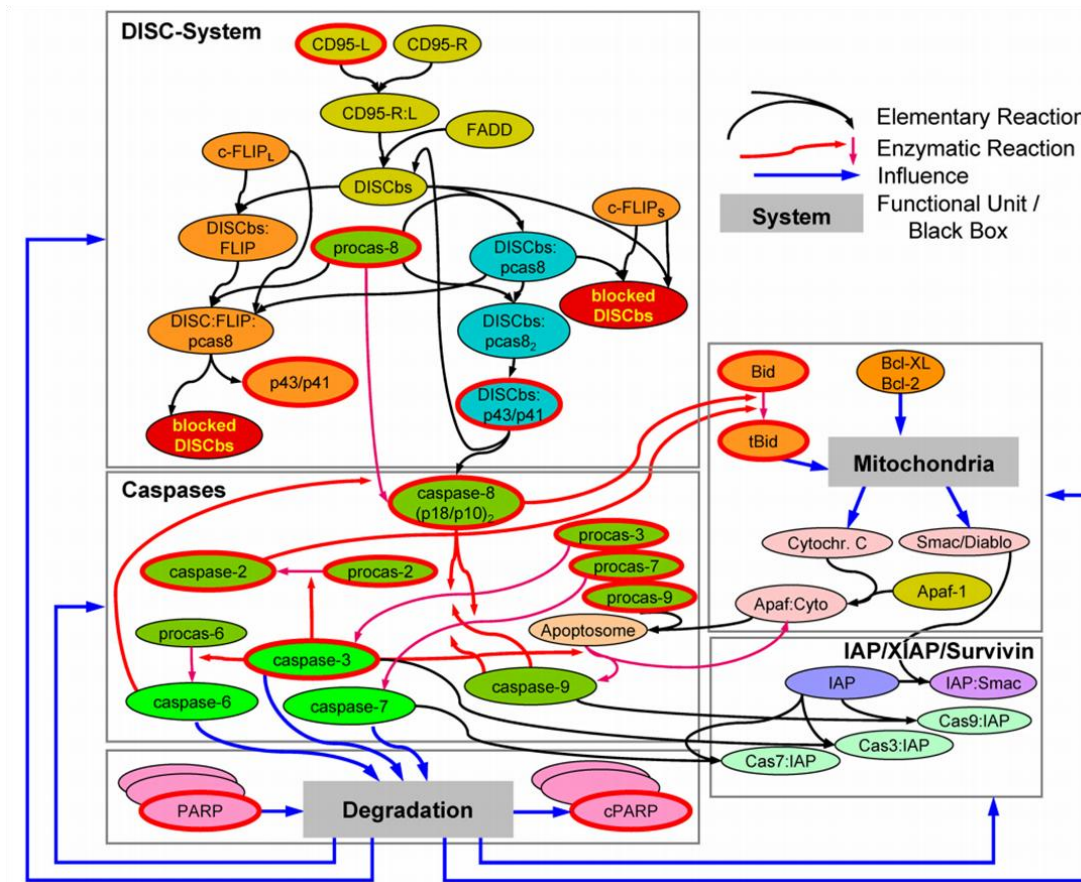


Figura 6: Representación de las principales interacciones entre los componentes de las principales vías de activación de la apoptosis, así como los principales reguladores de la red. [27]

Desde el punto de vista histológico, se puede observar en los tejidos la presencia de células en apoptosis. Cabe agregar que, si bien la activación de las caspasa ocurre en un periodo de un par de horas, se requiere de mucho más tiempo para que se vea afectada la morfología celular [26] (a causa de la regulación de la vía que asegura que se active en el momento adecuado). Además, los cuerpos apoptóticos una vez formados son rápidamente eliminados por los macrófagos residentes en los tejidos.

En este tipo de células, utilizando microscopía se puede observar la condensación y fragmentación del DNA, y la formación de protrusiones (“blebbing”) (Figura 7). Esto se debe al desprendimiento de los cuerpos apoptóticos lo que da esa forma característica a las células que están en fases tardías de la apoptosis. A su vez, a través de técnicas de marcado, se ha logrado determinar la exposición de fosfolípidos como la fosfatidilserina que en condiciones normales está presente en la cara interior de la membrana lipídica [31]. Se cree que este cambio en la asimetría de la membrana ocurre por el deterioro de los mecanismos que trasladan los lípidos a su posición normal.

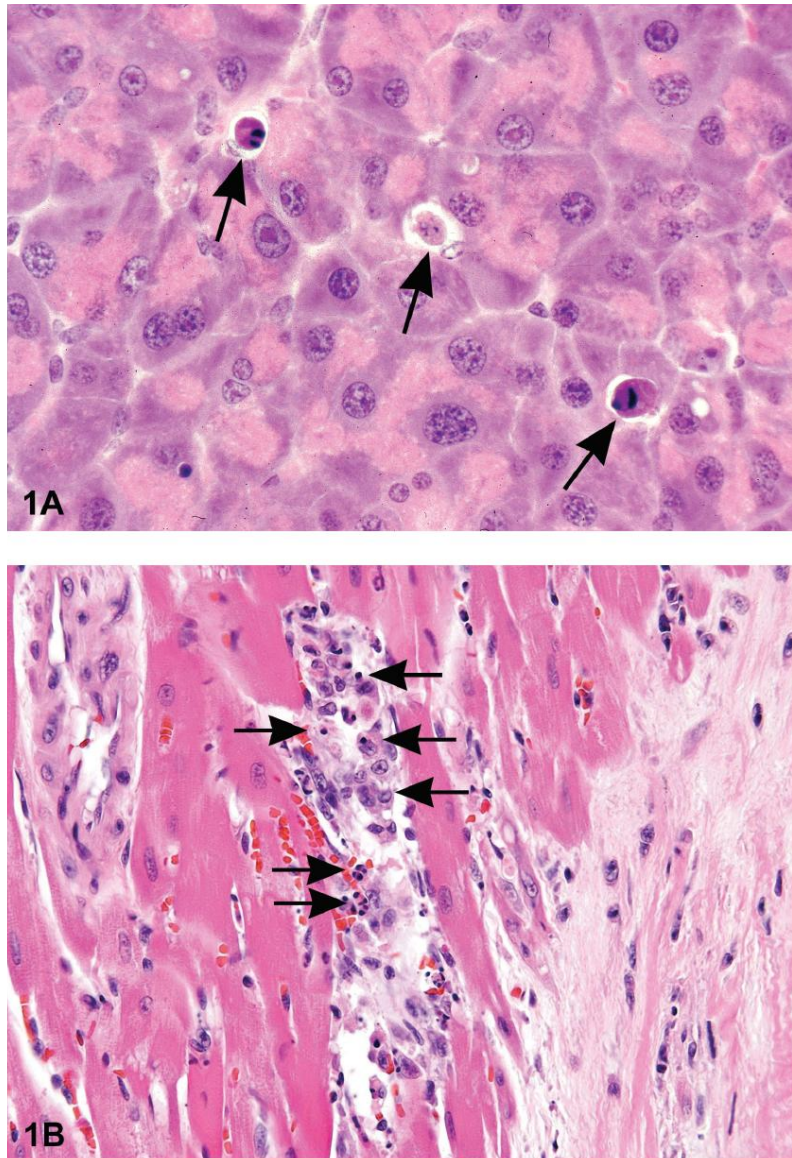


Figura 7: Cortes de tejidos donde se observa la presencia de células en apoptosis, señaladas con una flecha. Se observa claramente la condensación del material genético y en algunas la presencia de protrusiones. [26]

1.3.2. Modelos matemáticos

Entonces dada la importancia y complejidad de la apoptosis, se han diseñado numerosos modelos matemáticos capaces de explicar el comportamiento dinámico de la vía e identificar los principales mecanismos de regulación. En particular se han generado diferentes modelos de ecuaciones que describen los diferentes componentes de las vías de activación de la apoptosis y la interacción entre los mismos. Por ejemplo, el modelo propuesto por Bentele et al. [32] fue uno de los primeros modelos basados en datos experimentales, que intenta modelar la activación de la apoptosis por la estimulación de la vía extrínseca por CD95. En éste se describen las interacciones por medio de una compleja red de señalización, que se activa cuando el estímulo supera un umbral. Si bien este modelo se enfoca en la vía

extrínseca, considera también los componentes de la intrínseca, ya que existe una estrecha vinculación entre los mismos [26]. También para la vía extrínseca está el modelo de Eissing et al. [33], que describe los principales eventos de la vía por medio de ecuaciones diferenciales basadas en leyes de velocidad de acción de masas. Con el mismo se determinó la biestabilidad en la activación de la vía extrínseca. Posteriormente, Hyung-Seok Choi et al. [15] retomó el modelo de Eissing et al. y estudió la estructura de feedbacks acoplados para explicar la dinámica hallada previamente.

Otros modelos fueron desarrollados enfocados en la vía intrínseca de la apoptosis, por ejemplo, el de Legewie et al. [34], que también utiliza ecuaciones diferenciales para describir los principales componentes de la vía, entre ellos las caspasas 3 y 9, utilizando como estímulo la formación del apoptosoma.

También se han creado modelos para estudiar la contribución de las diferentes etapas de la apoptosis en el comportamiento dinámico exhibido por la vía, así como su importancia a la hora de desencadenar la respuesta. Un ejemplo es el modelo de Harrington et al. [35] para el reclutamiento del receptor de muerte celular causada por la estimulación vía ligando Fas. El trabajo muestra cómo este paso de la vía es capaz de inducir comportamiento biestable e irreversible en la misma, debido a que el reclutamiento de Fas, genera un feedback positivo que autoestimula su multimerización.

Se han utilizado modelos de redes booleanas para explicar la dinámica de funcionamiento de la apoptosis, aunque en menor medida. Tienen el inconveniente de que no permiten modelar la variación de las concentraciones de los componentes [36]. Existen ejemplos en los que se incluye en el análisis otras formas de muerte celular programada, como necrosis y autofagia [25]. En este caso, en base a la red de interacciones entre los mecanismos de muerte celular, se estudió la relevancia estructural de los componentes, observando cómo la eliminación de los mismos perturba el funcionamiento de la red, modelada como red booleana. A su vez, en este trabajo se utilizaron en paralelo abordajes experimentales, llegando a la conclusión de cuáles son los componentes principales que deberían ser regulados para optimizar el funcionamiento de la red de muerte celular programada [25].

También se han realizado estudios acerca de la regulación de la apoptosis durante el desarrollo embrionario y su papel en la formación de órganos y tejidos. Particularmente se han estudiado los modelos de *C. elegans* y *D. melanogaster* para entender cómo se regula la expresión génica de los componentes de la apoptosis, principalmente basados en redes de regulación transcripcional construidas a partir del uso de técnicas moleculares como RNA de interferencia. También se han estudiado otros mecanismos de regulación de la expresión génica, como el transporte de RNA mensajeros o mecanismos de comunicación celular [37].

En resumen, se han creado diversos modelos matemáticos con diversas aproximaciones dependiendo del aspecto de la apoptosis a investigar, ya sean características estructurales o de funcionamiento. Muchos de estos modelos se han creado con la perspectiva de identificar los principales reguladores de cada etapa de la vía y así corregir patologías asociadas a la desregulación de la apoptosis (por una recopilación de los modelos desarrollados para la apoptosis consultar el libro “Systems Biology of Apoptosis” [39]).

2. Materiales y métodos

2.1. Herramientas matemáticas

En este trabajo, para estudiar los modelos se utilizaron sistemas de ecuaciones diferenciales para describir el comportamiento de los distintos componentes del sistema. Entonces, el cambio temporal de la concentración de cada especie se describe en función de las leyes de velocidad de las reacciones en las que participa.

El sistema de ecuaciones se representa mediante una ecuación diferencial matricial:

$$\frac{dX}{dt} = N \cdot v = f(X)$$

donde X es el vector de las concentraciones de las especies, N es la matriz de coeficientes estequiométricos y v es el vector de las velocidades. En el estado estacionario $\left(\frac{dX}{dt}\right) = 0$ y entonces:

$$N \cdot v = 0$$

donde 0 es un vector de ceros.

Si para un estado estacionario dado, la parte real de todos los valores propios λ_i de la matriz jacobiana $\left(J = \frac{\partial f(X)}{\partial X} \Big|_{ee}\right)$ es negativa, entonces el estado es estable. En cambio, si alguno de los valores propios tiene parte real positiva, significa que el estado es inestable.

El procedimiento seguido es el siguiente. Primero se estudia si la estructura del sistema de ecuaciones diferenciales tiene algún motivo que genera inestabilidad y que hace que potencialmente pueda presentar biestabilidad [6]. En caso que el sistema posea estructuras capaces de causar inestabilidades, se asignan leyes de velocidad plausibles a cada una de las etapas y se resuelve el sistema de ecuaciones diferenciales igualado a cero. El cálculo se realiza variando el valor de uno de los parámetros del sistema

(parámetro de bifurcación) y se observa cómo varían las concentraciones estacionarias y cuántos estados estacionarios presenta el sistema para cada valor del parámetro. Seguidamente se estudia la estabilidad de los estados estacionarios para determinar cuáles son estables y cuáles inestables. Cuando para un valor dado de parámetro de bifurcación existen dos soluciones estables y una inestable que las separa tenemos que el sistema presenta comportamiento biestable. Finalmente los resultados obtenidos se corroboraron realizando la simulación numérica de las ecuaciones diferenciales para obtener los cursos temporales de las concentraciones en la proximidad de los estados estacionarios

Para los cálculos de los estados estacionarios y su estabilidad, así como para la simulación numérica de los cursos temporales se elaboraron programas para el software Mathematica.

2.2. Modelos.

Inicialmente, se estudió un modelo mínimo que presenta biestabilidad descrito en la bibliografía a efectos de verificar que los programas elaborados para aplicar los métodos funcionaban correctamente.

Este modelo consiste en un sistema ramificado con un único metabolito y tres velocidades (Figura 8) el cual presenta inhibición por exceso de sustrato en la reacción 3 [38]. Las ecuaciones de velocidad del sistema son:

$$v_1 = v_{in}$$

$$v_2 = k_2 \cdot S$$

$$v_3 = \frac{k_3 \cdot S}{1 + (S/K_i)^{nH}}$$

siendo S variable y v_{in} , k_2 , k_3 , K_i , nH los parámetros del sistema.

Para éste, además se hizo un estudio de la variación del rango de biestabilidad que no fue realizado en la referencia bibliográfica [38]. El rango de biestabilidad es una manera de estimar el tamaño del espacio de parámetros compatibles con la biestabilidad. Para realizar este cálculo, se buscó la expresión $k_2 = f(S)$ y se determinaron los extremos de la función que corresponden a los límites del intervalo de k_2 en el cual el sistema es biestable [39]. La resta de estos extremos es la amplitud del rango de biestabilidad. Se realizó el mismo cálculo variando los distintos parámetros del sistema obteniéndose curvas de variación del rango de biestabilidad.

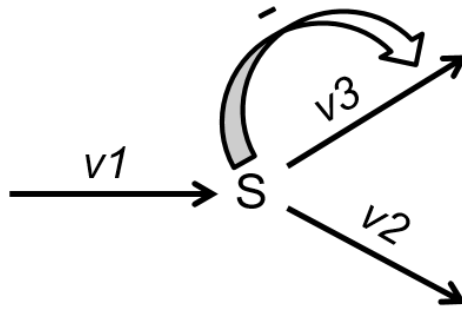


Figura 8: Representación del modelo de inhibición por exceso de sustrato [38].

Después, se buscó en la bibliografía un modelo dinámico más complejo que presenta biestabilidad. Se eligió el modelo de Legewie et al. [34], con 13 metabolitos y 28 velocidades que describe la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Figura 9). Las velocidades están definidas como leyes de acción de masas, reversibles o irreversibles dependiendo de la reacción, utilizando parámetros obtenidos de datos experimentales o estimados.

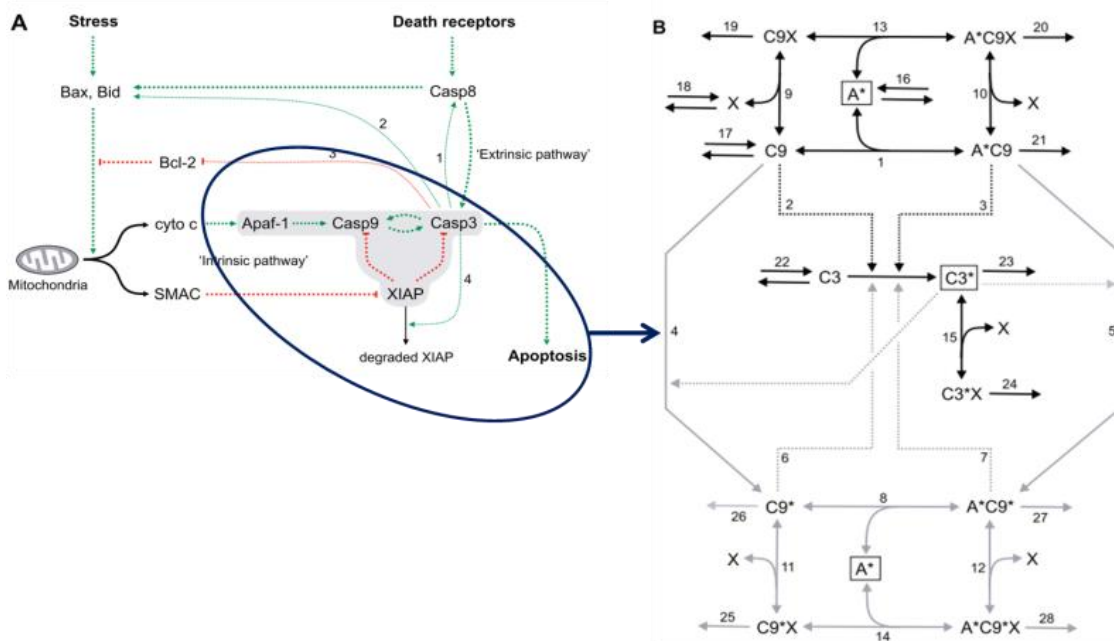


Figura 9: Modelo de Legewie et al. para la vía intrínseca de la apoptosis. A la derecha aparece el esquema de las reacciones consideradas en el modelo, basado en una porción del modelo básico de apoptosis (izquierda) [34].

Este modelo describe la activación de la vía intrínseca de la apoptosis a partir de la unión de Apaf-1 con el citocromo C y su heptamerización (A^*) como estímulo desencadenante de la apoptosis. Este complejo se une a la caspasa 9 (C9) que puede autocliversarse, y por tanto aumentar su actividad ($C9^*$), o clivar a la caspasa 3 (C3) y activarla ($C3^*$). En este modelo en particular se consideran en las ecuaciones la activación de la caspasa 3 pero no el auto

clivaje C9 espontaneo por no tener un aporte significativo a la producción de C9*, a diferencia de la unión a A* o el clivaje de C9 por C3*. Además, se establece un feedback positivo, ya que C3 es capaz de activar a C9 tanto unida a A* como libre. También se establece un doble feedback negativo (que tiene el efecto neto de un feedback positivo), debido a que el modelo incluye a XIAP (X), un inhibidor de la apoptosis que se une tanto a C3* como a C9 en todas sus formas promoviendo su degradación. Como indicador de la activación de la vía apoptótica, se emplea la activación de caspasa 3, dado que ésta es la responsable de ejecutar la muerte celular.

A su vez, se estudió un modelo para la vía extrínseca de la apoptosis. Se utilizó el modelo de Eissing et al. [33] que está compuesto por 13 velocidades y 8 ecuaciones diferenciales e incluye la activación de la vía por la caspasa 8, la inhibición de C3* por las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) y la inhibición de C8* por la proteína BAR (Figura 10). En este caso se consideran los metabolitos básicos para modelar la vía (C3 y C8) así como los principales reguladores (IAPs y BAR). Se mide la activación de la vía en base a la producción de C3*, igual que en [34].

Empleando los modelos descritos en esta sección se realizarán dos tipos de estudios. Primeramente, se reproducirán algunos de los resultados que se describen en la bibliografía. De esta forma se verificará que con las herramientas computacionales desarrolladas en este trabajo se obtiene los resultados esperados. Luego, se realizarán estudios que no han sido reportados en la bibliografía. En el caso del modelo metabólico de prueba se calculará el rango de biestabilidad de S vs k_2 , para los diferentes parámetros. Para los modelos de apoptosis, se reducirán y combinarán los modelos descritos en la bibliografía para determinar como estas modificaciones afectan el comportamiento biestable que presentan. En particular, se eliminarán los componentes inhibitorios y se estudiará si solamente con las estructuras causantes de inestabilidad, basadas en feedback positivos, los comportamientos biestables se mantienen.

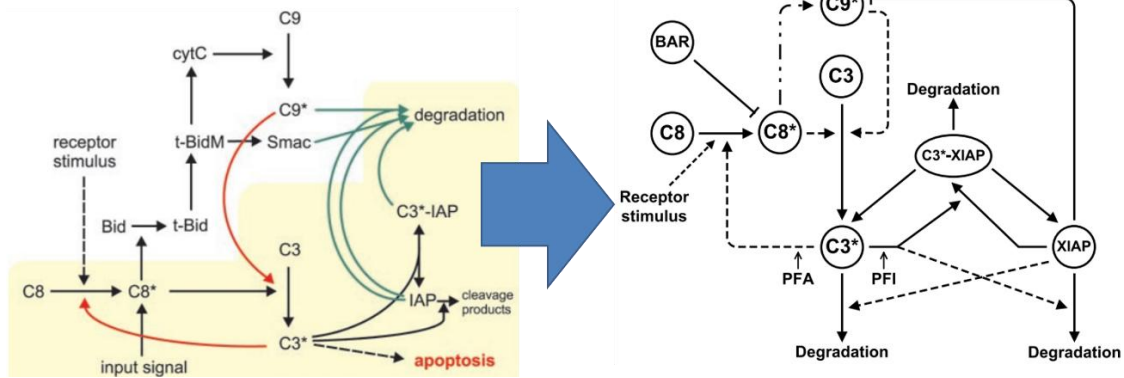


Figura 10: Esquema del modelo desarrollado por Eissing et al [33] para la activación de la vía extrínseca de la apoptosis. A la derecha se aprecian las interacciones incorporadas en las ecuaciones del modelo.

3. Resultados y discusión

3.1. Modelo metabólico de prueba.

El primer paso del trabajo fue el estudio del modelo mínimo con inhibición por exceso de sustrato [38] tanto para ensayar una primera aproximación a este tipo de análisis como para verificar que la implementación del método fuera adecuada. En cada caso los resultados obtenidos se corresponden con los reportados en la bibliografía.

A este modelo se le aplicó el análisis para determinar la existencia de estructuras capaces de causar inestabilidad y se estudió el rango de biestabilidad tal como fue descrito en materiales y métodos.

Primero que nada, el análisis reveló que el sistema posee la estructura adecuada para exhibir biestabilidad. Al graficar las distintas velocidades (en este caso $v_1 - v_2$ y v_3) en función de la concentración de S , el punto donde se interceptan las curvas, o sea donde se cumple $v_1 - v_2 - v_3 = 0$, corresponde a un estado estacionario y en el caso de que para un conjunto de velocidades haya tres estados de S posibles, el sistema es biestable.

Si variamos el parámetro k_2 , manteniendo el resto de los parámetros fijos, como se puede ver en la Figura 11, tenemos que para los valores 0,07 y 0,2 el sistema es monoestable y para $k_2 = 0,11$, el sistema es biestable.

Esto muestra que, si bien el análisis permite determinar que una estructura es potencialmente inestable, es decir que puede llegar a presentar multiestabilidad, no quiere decir que para todas las leyes de velocidad ni para todos los valores de los parámetros esto ocurra.

Observar que, si se modifica v_3 , cambiando la inhibición por sustrato a, por ejemplo, Michaelis-Menten irreversible ya no se obtiene biestabilidad para ningún conjunto de parámetros. Esto se puede ver gráficamente ya que al ser

$v_1 - v_2$ una función lineal de S y v_3 una hipérbola rectangular, éstas nunca podrían cortarse más de una vez. Dicho de otra manera, no hay ninguna combinación de parámetros para la cual $v_1 - v_2 - v_3 = 0$ tenga más de una solución.

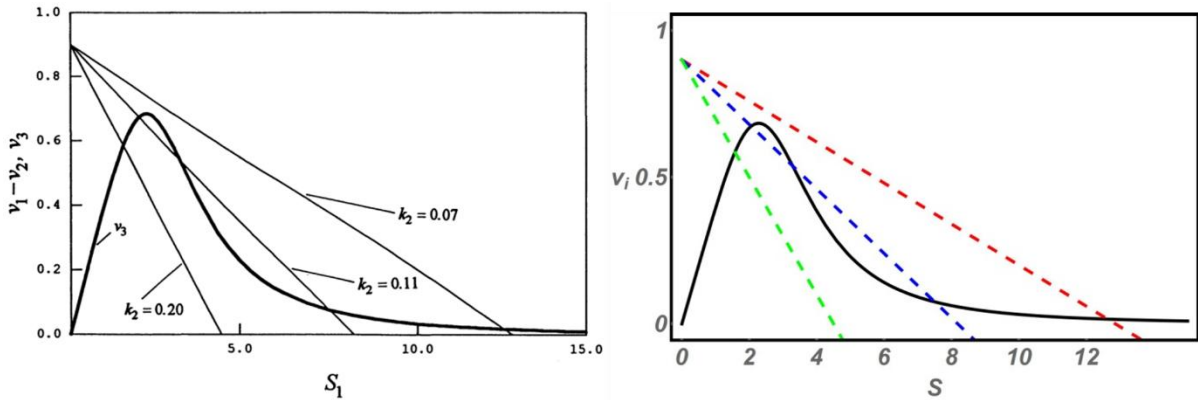


Figura 11: Gráficos de la variación de las distintas velocidades en función de la concentración de S . A la izquierda se observa el resultado reportado en la bibliografía [38] y a la derecha el que hemos reproducido para el mismo sistema y los mismos valores de parámetros. Recta verde $k_2 = 0.20$, azul $k_2 = 0.11$ y rojo $k_2 = 0.07$. En ambos casos, variando k_2 se puede ver como la cantidad de estados estacionarios depende no únicamente de la estructura y leyes de velocidad, sino también de los valores parámetros. Los valores de los otros parámetros son: $v_{in} = 0.9$; $k_3 = 0.4$; $K_i = 3$; $n_H = 4$;

Al realizar un diagrama de bifurcación (Figura 12) para ver cómo varían las soluciones S en función del parámetro k_2 se observa un comportamiento biestable, donde para ciertos valores de k_2 el sistema presenta dos estados estables y uno inestable. Esta estructura del diagrama de bifurcación es típica de sistemas biestables donde hay dos modos claros de funcionamiento (los dos estados estables) y uno de transición (el estado inestable).

Cabe de destacar que este sistema exhibe histéresis. El sistema de alguna manera tiene “memoria” de sus estados causando que los caminos para llegar y salir de un estado dado sean diferentes, es decir que el sistema guarda información de su estado anterior.

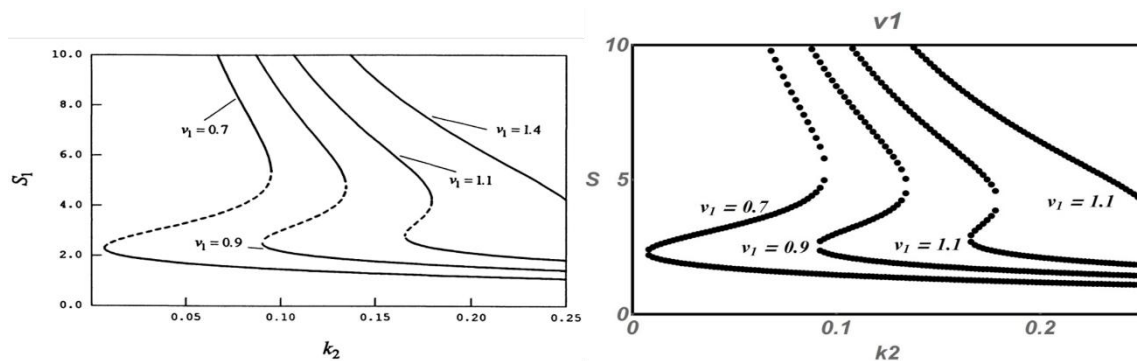


Figura 12: Diagramas de bifurcación de S vs k_2 para distintos valores de v_{in} . A la derecha aparece el resultado obtenido y a la izquierda el presentado en la bibliografía. Para los otros parámetros se utilizaron los valores: $k_3 = 0.4$; $K_i = 3$; $n_H = 4$; [38]

Como vemos, para cierto rango de valores de k_2 el sistema es biestable, pero a su vez, al variar otros parámetros cambia el intervalo en el cual puede variar k_2 manteniéndose la biestabilidad. Particularmente, al aumentar v_{in} vemos que disminuye el rango de biestabilidad, hasta que la biestabilidad desaparece (Figura 12).

Finalmente, para estudiar cómo afectan los valores de los diferentes parámetros la capacidad de exhibir comportamiento biestable, se calculó la amplitud del rango de biestabilidad para el parámetro k_2 variando los diferentes parámetros del sistema. El estudio realizado en el presente trabajo, no aparece reportado en la bibliografía.

En la Figura 13 se aprecia que la amplitud del rango de biestabilidad varía con todos los parámetros del sistema. Sin embargo, no lo hace de la misma manera. Por ejemplo, cuando se aumenta el valor de nH , después de que alcanza un cierto valor y comienza a haber biestabilidad, se mantiene este comportamiento. Tomando en cuenta que este parámetro es el coeficiente de Hill, que es un indicador de cooperatividad, vemos que el aumento en la cooperatividad tiene una influencia positiva en la biestabilidad (Figura 13b).

Pero, para el resto de los parámetros se ve que a partir de cierto valor del parámetro comienza a haber biestabilidad, la amplitud del rango de biestabilidad llega a un máximo y luego cae. La pendiente con la cual se llega al máximo de la amplitud del rango y con la que el sistema se aleja de él varía para cada parámetro. Esto implica que para cada uno de estos tres parámetros se puede encontrar una ventana donde la biestabilidad de S vs k_2 es clara, siendo v_{in} el que presenta una caída más rápida del rango de biestabilidad (Figura 13d).

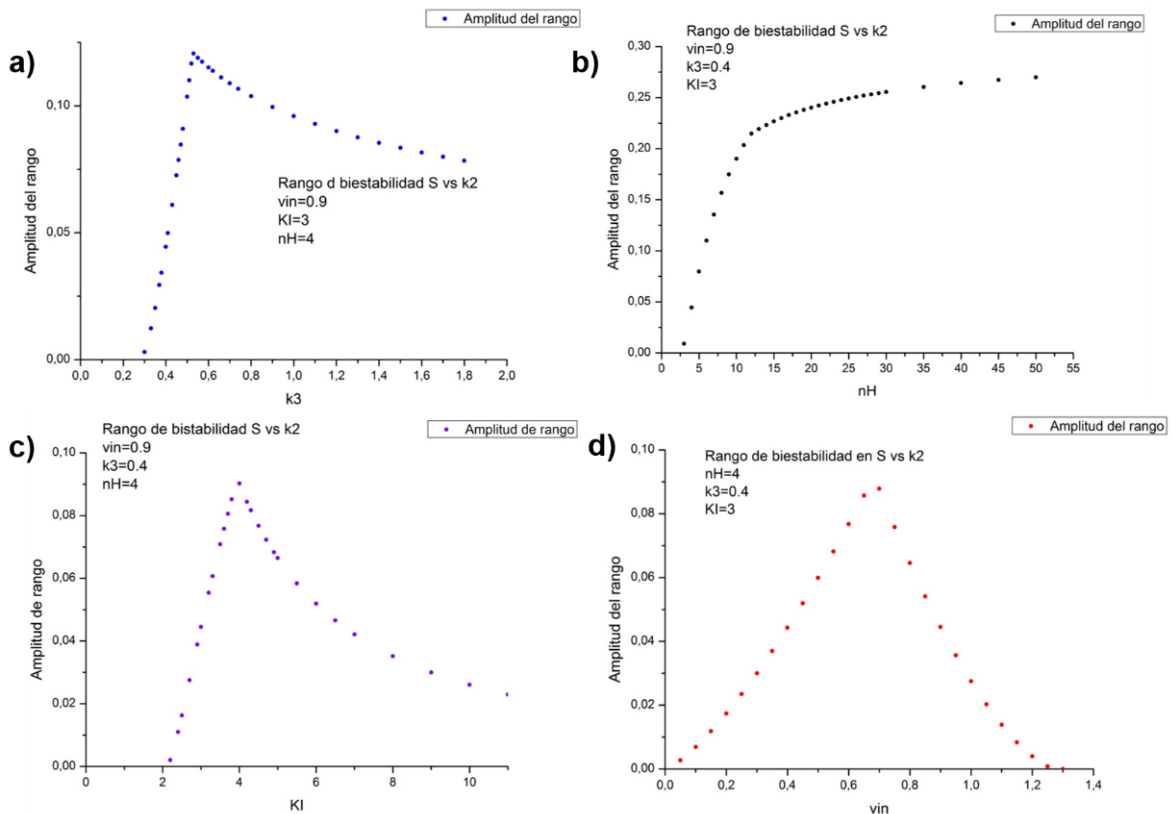


Figura 13: Variación de la amplitud del rango de biestabilidad de S vs k_2 variando cada uno de los parámetros del sistema, a) k_3 , b) nH , c) K_i , d) v_{in} .

3.2. Modelos de apoptosis.

3.2.1. Modelo de la vía intrínseca (Legewie et al. [34])

Como se dijo anteriormente, uno de los modelos estudiados en este trabajo fue el propuesto por Legewie et al. para la activación de la vía intrínseca de la apoptosis.

Inicialmente se analizó el modelo completo. Este posee varios feedback positivos y un doble feedback negativo, que son capaces de generar inestabilidad.

En la Figura 14. se aprecia que al aumentar la concentración de A^*_{tot} , disminuye el tiempo que tarda en desencadenarse la respuesta de activación de la caspasa 3. En otras palabras, cuanto mayor es la intensidad de estímulo, más rápidamente se alcanza la concentración de $C3^*$ necesaria para que se dispare la activación de la vía y llegue a un valor máximo.

Este resultado es coherente tanto con el que se obtiene en el trabajo original como con lo que se observa empíricamente en cuanto a la dinámica de activación de C3. En la figura se incluye gráfica extraída del artículo [34] y la calculada en el presente trabajo.

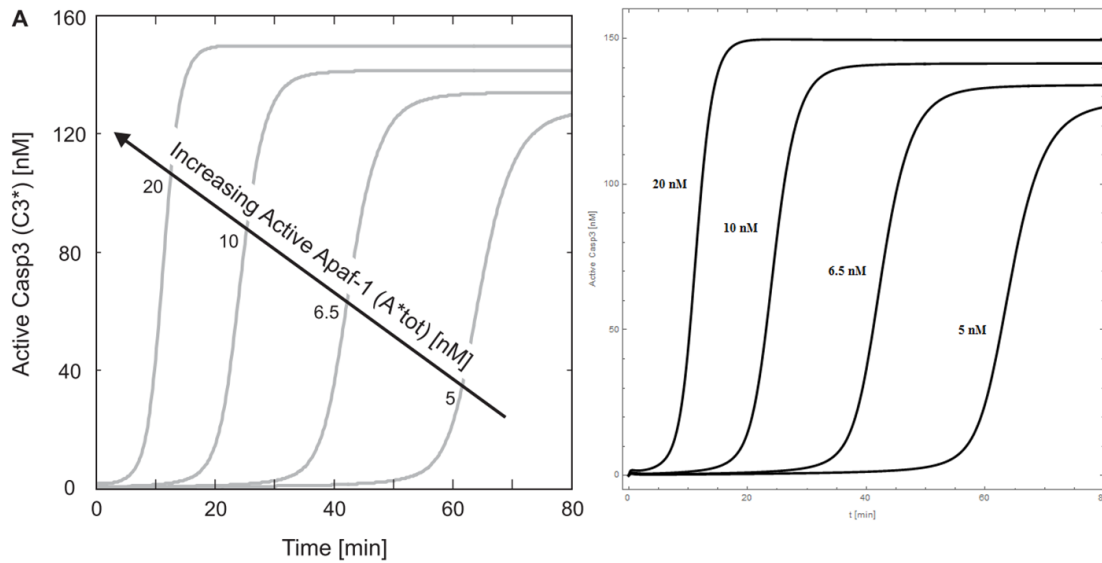


Figura 14: Curso temporal de la activación de C3. A la izquierda aparece el resultado obtenido en el artículo original [34] y a la derecha el obtenido en este trabajo. Las concentraciones de A^*_{tot} están indicadas a la izquierda de las curvas.

Además de estudiar el comportamiento temporal de la activación de la apoptosis, se estudió la estabilidad.

Observando el diagrama de bifurcación (Figura 15) tenemos que el sistema presenta comportamiento biestable. En la figura se incluye la gráfica extraída del artículo y la calculada en el presente trabajo. Se tiene que cuando la concentración de A^*_{tot} alcanza un valor umbral se pasa de un estado de baja cantidad de C3 activa, a otro donde gran parte de C3 se encuentra como la forma activa ($C3^*$). Este resultado es consistente con la forma en la que funciona la apoptosis en las células, donde cuando el estímulo relacionado con el daño celular llega a cierto límite, se desencadenan los mecanismos que dan lugar a la ejecución de la muerte celular. Siempre es importante cuando se trata de modelos matemáticos que representan un fenómeno biológico que exista un diálogo entre lo teórico y lo experimental. Se requiere que el modelo tenga coherencia con la realidad, para poder tener cierta confianza en las conclusiones que se desprendan de él en los aspectos que no pueden ser estudiados experimentalmente.

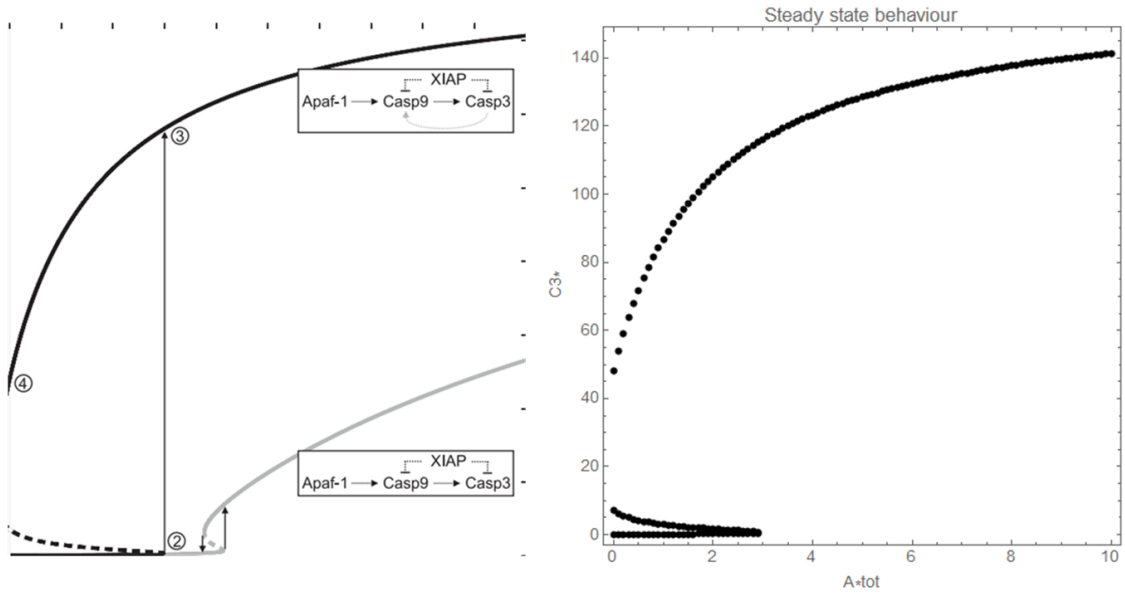


Figura 15: Diagrama de bifurcación. $[C3^*]$ vs A^*_{tot} . Se reproducen los resultados obtenidos por Legewie et al. para el modelo completo. A la izquierda se encuentra el resultado del artículo y a la derecha el resultado obtenido a partir de los cálculos realizados

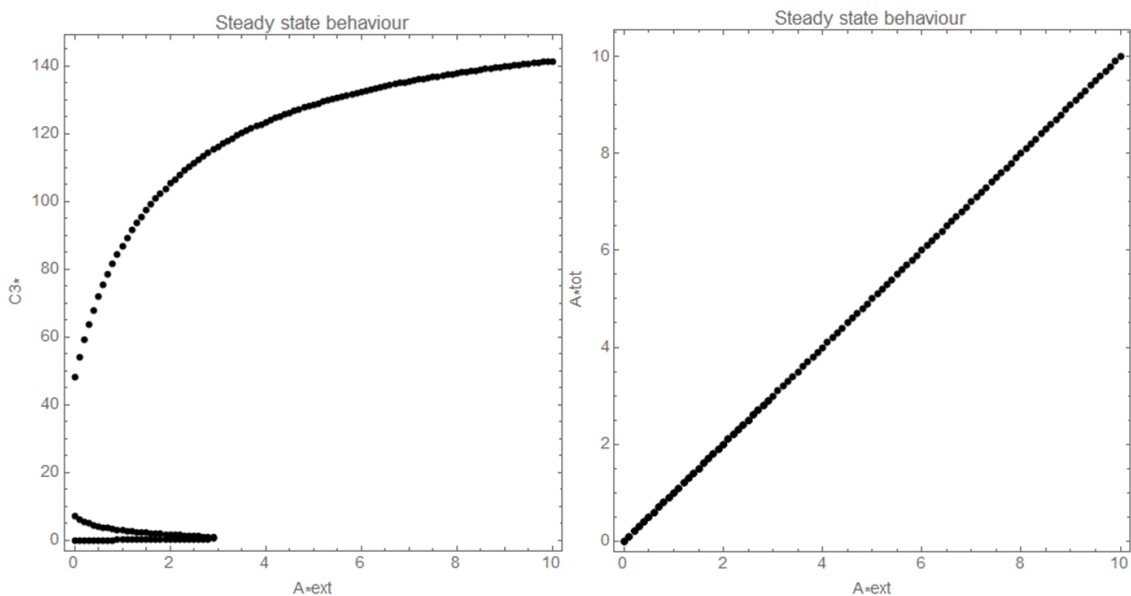


Figura 16: Diagrama de bifurcación (izquierda) utilizando como parámetro de bifurcación la cantidad de A^* externo, es decir una concentración constante de A^* (A^*_{ext}), incorporada en la velocidad 16 ($v_{16} = k_{-16} \cdot A_{ext} - k_{16} \cdot A^*$) que describe la síntesis de A^* y su tasa de degradación. Se modifica el valor de $k_{-16} = 0.001$ para que A^*_{tot} y A^*_{ext} sean iguales (derecha).

En paralelo, se realizó el mismo análisis, pero utilizando A^*_{ext} (A^* externo) como parámetro de bifurcación (Figura 16), siendo este definido como la concentración externa constante de A^* y se obtiene claramente un resultado análogo al obtenido con A^*_{tot} . Nuevamente se tiene que el sistema presenta

comportamiento biestable con las leyes de velocidad y los parámetros utilizados. En el artículo de referencia se estudia principalmente la capacidad del doble feedback negativo de generar biestabilidad.

3.2.2. Modelo reducido de la vía intrínseca.

Dado que ya se conoce la relevancia del doble feedback negativo para la biestabilidad [34], se intentó determinar si en ausencia de esta estructura el sistema era capaz de mantener el comportamiento biestable. Para ello se eliminó X (XIAP) que es el responsable de generar esa doble inhibición, desapareciendo a su vez todas las especies que involucran a X (X, C9X, C9*X, A*C9X, A*C9*X, C3*X). También se eliminaron las leyes de velocidad que describían estas especies. Así se obtuvo el modelo esquematizado en la Figura 17, con 7 especies y 15 velocidades .

Las velocidades del modelo son:

$$\begin{aligned}
 v1 &= k_1 \cdot A^* \cdot C9 - (k_{-1} \cdot A^* C9) \\
 v2 &= k_2 \cdot C3 \cdot C9 \\
 v3 &= k_3 \cdot C3 \cdot A^* C9 \\
 v4 &= k_4 \cdot C9 \cdot C3^* \\
 v5 &= k_5 \cdot A^* C9 \cdot C3^* \\
 v6 &= k_6 \cdot C3 \cdot C9^* \\
 v7 &= k_7 \cdot C3 \cdot A^* C9^* \\
 v8 &= k_8 \cdot C9^* \cdot A^* - (k_{-8} A^* C9^*) \\
 v16 &= k_{-16} \cdot A_{ext} - k_{16} \cdot A^* \\
 v17 &= k_{-17} - k_{17} \cdot C9 \\
 v21 &= k_{21} \cdot A^* C9 \\
 v22 &= k_{-22} - (k_{22} \cdot C3) \\
 v23 &= k_{23} \cdot C3^* \\
 v26 &= k_{26} \cdot C9^* \\
 v27 &= k_{27} \cdot A^* C9^*
 \end{aligned}$$

Mientras, las ecuaciones diferenciales del modelo son:

$$\begin{aligned}
 \frac{dA^*}{dt} &= -v1 - v8 + v16 \\
 \frac{dC9}{dt} &= -v1 - v4 + v17 \\
 \frac{dC3}{dt} &= -v2 - v3 - v6 - v7 + v22 \\
 \frac{dA^* C9}{dt} &= v1 - v5 - v21
 \end{aligned}$$

$$\frac{dC3^*}{dt} = v2 + v3 + v6 + v7 - v23$$

$$\frac{dC9^*}{dt} = v4 - v8 - v26$$

$$\frac{dA^*C9^*}{dt} = v5 + v8 - v27$$

En este nuevo modelo se estudio la existencia de estructuras causantes de inestabilidad [6] y se realizaron los cálculos numéricos para determinar los valores de parámetros para los cuales el sistema es biestable. Se construyeron los cursos temporales y el diagrama de bifurcación.

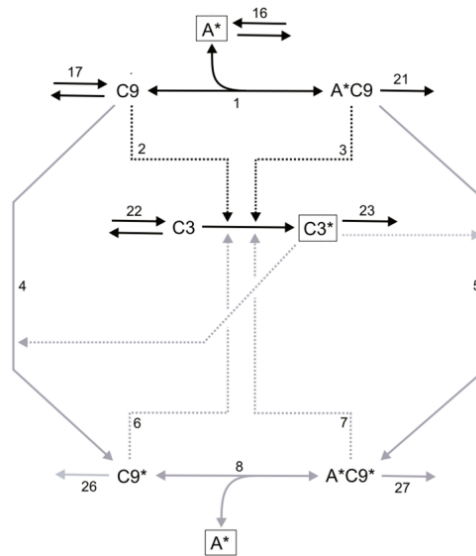


Figura 17: Modelo de apoptosis reducido eliminando el inhibidor XIAP y las especies relacionadas con el mismo.

Se obtuvo que el sistema presenta estructuras causantes de inestabilidad. Analizando estos resultados se encontraron cuatro feedbacks positivos que podrían estar involucrados en la existencia de inestabilidad del sistema. (Figuras 18 y 19). Todos ellos son consistentes con la retroalimentación positiva ente caspasa 3 y 9, que en base al conocimiento que se tiene del sistema, son los que deberían permanecer al eliminar el doble feedback negativo de XIAP.

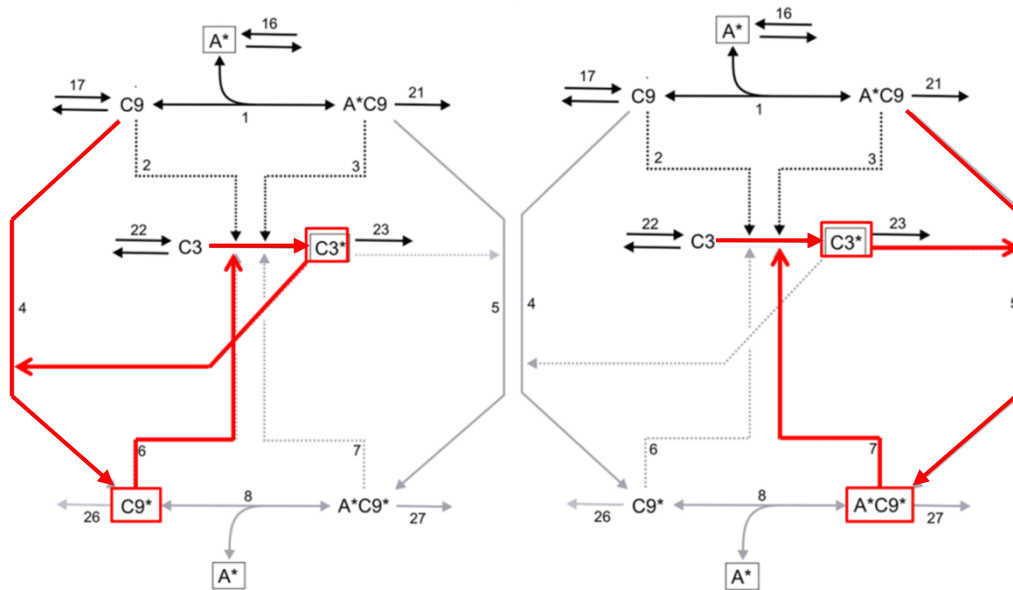


Figura 18: Feedbacks positivos de dos componentes obtenidos a partir del análisis del modelo de apoptosis reducido. Las interacciones involucradas en los feedbacks aparecen marcadas en rojo.

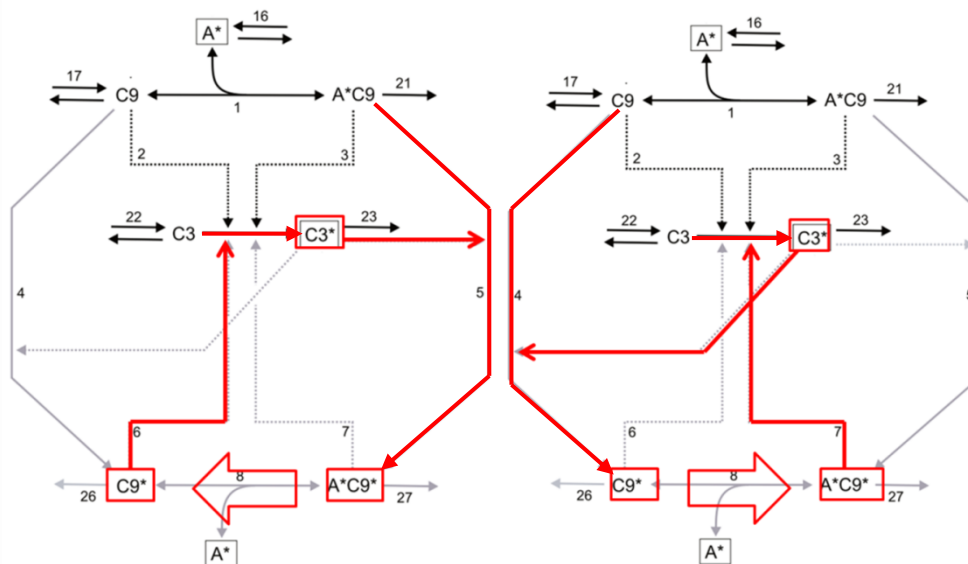


Figura 19: Feedbacks positivos de tres componentes obtenidos a partir del análisis del modelo de apoptosis reducido. Las interacciones involucradas en los feedbacks aparecen marcadas en rojo.

Al existir estructuras causantes de inestabilidad en el sistema, es posible que se pueda encontrar biestabilidad en el mismo. Entonces, se analizó la variación de $C3^*$ en estado estacionario en función de A^*_{ext} (que es equivalente a hacerlo con A^*_{tot}).

Sin embargo, a pesar de las estructuras favorables del sistema, no se encontró comportamiento biestable con las leyes de velocidad y parámetros utilizados en la bibliografía [34] (Figura 20). Se muestran solo los resultados en función de A^*_{ext} , pero se realizó el diagrama para varios de los parámetros del sistema, incluyendo diagramas de bifurcación para cada parámetro variando un segundo

parámetro y en ningún caso se observó biestabilidad. También se modificaron las leyes de velocidad, en las reacciones involucradas en los feedback (por ejemplo v_5 y v_7), elevando al cuadrado algunos términos sin observar biestabilidad para los valores de parámetros explorados.

Adicionalmente se realizó el curso temporal de $C3^*$ vs t y se obtuvo que, a diferencia del modelo completo, se observa que rápidamente toda la caspasa 3 disponible se activa llegando a un valor máximo (Figura 21). Lo que ocurre es que al eliminar la inhibición por parte de X (XIAP), nada impide (dentro de los componentes que estamos considerando en el modelo) que la apoptosis se desencadene espontáneamente. Esto refleja la importancia de que existan mecanismos de regulación negativa en estas vías, para que efectivamente no se activen si no es necesario.

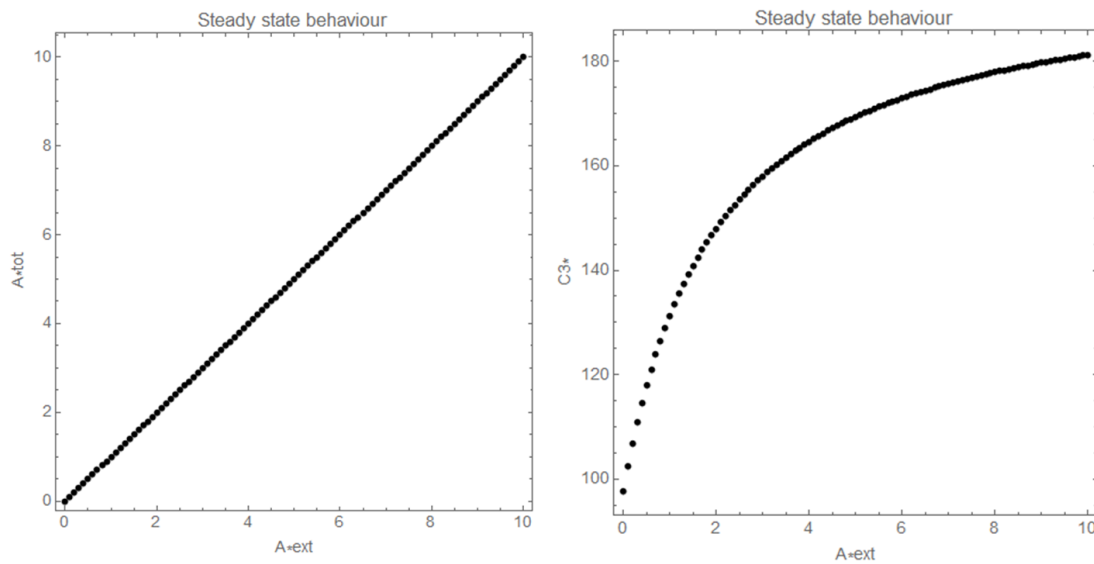


Figura 20: Análisis de estabilidad realizado para el modelo de apoptosis reducido. A la derecha se observa el diagrama de bifurcación de $C3^*$ en función de A^{*ext} , donde se ve claramente que el sistema no presente biestabilidad (en este caso utilizando los parámetros reportados). A la izquierda se muestra la correlación entre A^{*tot} y A^{*ext} .

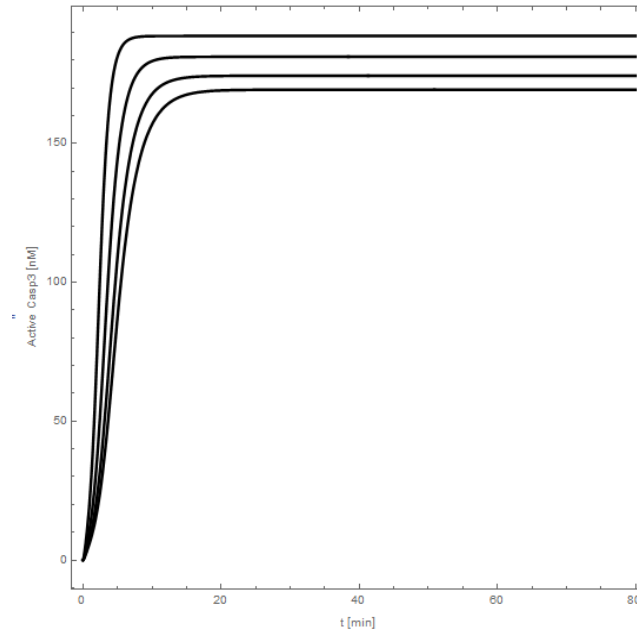


Figura 21: Curso temporal para la activación de caspasa 3 (C3*)

3.2.3. Modelo de la vía extrínseca (Eissing et al. [33])

Paralelamente se estudió el modelo de Eissing et al. para la activación de la apoptosis [33]. Igual que para el modelo anterior se reprodujeron los resultados de la bibliografía, obteniéndose que el modelo presenta biestabilidad para el rango de parámetros reportado (Figura 22) [33]. En otras palabras, tanto para la vía intrínseca como extrínseca de la apoptosis se encuentra biestabilidad, utilizando ley de acción de masas. Pero, como vimos en la sección anterior, al eliminar el doble feedback negativo de la vía intrínseca, no se logra encontrar biestabilidad. De la misma manera, se intentará determinar si al eliminar los componentes inhibidores de la vía extrínseca, se pierde el comportamiento biestable.

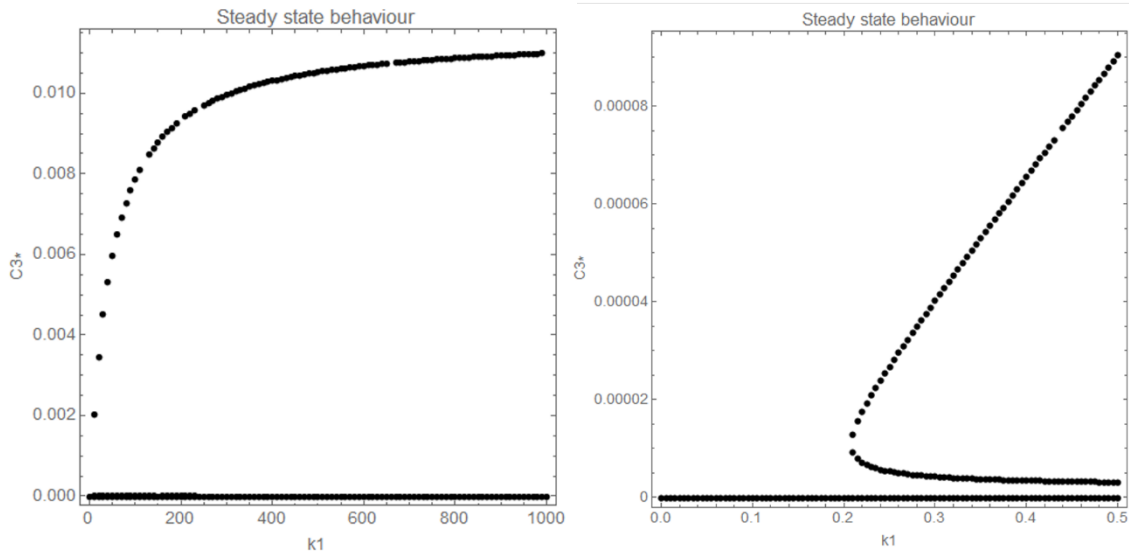


Figura 22: Diagrama de bifurcación para el modelo de Eissing et al. Se representa $C3^*$ en función de k_1 como parámetro de bifurcación. Los parámetros utilizados, corresponden a los reportados en [33]. A la izquierda se observa el diagrama de bifurcación completo y a la derecha la porción correspondiente a bajas concentraciones de $C3^*$ ampliada.

3.2.4. Modelo reducido de la vía extrínseca

Para reducir el modelo de la vía extrínseca se eliminaron BAR, IAP, y los complejos que estas forman con las caspasas 3 y 8. De esta forma se obtuvo un modelo mínimo de la vía extrínseca de la apoptosis formado por cuatro especies: $C3$, $C3^*$, $C8$ y $C8^*$ (Figura 23). En este esquema $C8$ y $C8^*$ representan el estímulo de activación, ya que median la interacción entre los receptores de muerte y los mecanismos efectores, mientras que $C3$ y $C3^*$ representan los efectores de la vía apoptótica. Este modelo reducido presenta un feedback positivo ($C3^*$ activa el clivaje de $C8$ y $C8^*$ activa el clivaje de $C3$) potencial generador de biestabilidad, pero no tienen los componentes inhibidores de apoptosis mediados por BAR y IAP.

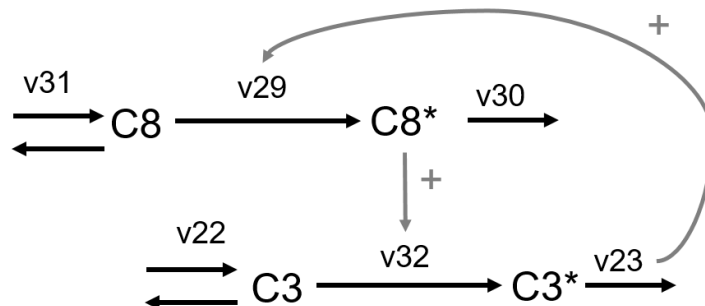


Figura 23: Esquema del modelo reducido de la vía extrínseca. Se consideran los componentes $C3$, $C3^*$, $C8$ y $C8^*$

Entonces, se realizó un estudio considerando únicamente las especies C3, C3*, C8 y C8*, describiendo las leyes de velocidad mediante acción de masas, obteniéndose un sistema de 4 ecuaciones, siendo las velocidades.

$$\begin{aligned}v_{22} &= k_{22r} - k_{22} \cdot C3 \\v_{23} &= k_{23} \cdot C3^* \\v_{29} &= k_{29} \cdot C8 \cdot C3^* \\v_{30} &= k_{30} \cdot C8^* \\v_{31} &= k_{31r} - k_{31} \cdot C8 \\v_{32} &= k_{32} \cdot C3 \cdot C8^*\end{aligned}$$

Se utilizó k_{31r} como parámetro de bifurcación. Al resolver el estado estacionario del modelo de manera analítica, se obtuvo que para leyes de velocidad de acción de masas, el sistema puede presentar únicamente dos estados estacionarios. Utilizando el criterio de Routh-Hurwitz [6], se determinó a partir del término independiente (b_0) del polinomio característico, que los estados obtenidos no pueden ser ambos estables al mismo tiempo. El primer estado estacionario es:

$$C3 = \frac{k_{22r}}{k_{22}}; C3^* = 0; C8 = \frac{k_{31r}}{k_{31}}; C8^* = 0;$$

El valor de b_0 para este estado estacionario es:

$$b_0 = k_{22} \cdot k_{23} \cdot k_{30} \cdot k_{31} - k_{22r} \cdot k_{29} \cdot k_{31r} \cdot k_{32}$$

El otro estado estacionario es:

$$\begin{aligned}C3 &= \frac{k_{22r} \cdot k_{29} \cdot k_{30} + k_{23} \cdot k_{30} \cdot k_{31}}{k_{29} \cdot (k_{22} \cdot k_{30} + k_{31r} \cdot k_{32})}; \\C8 &= \frac{k_{22} \cdot k_{23} \cdot k_{30} + k_{23} \cdot k_{31r} \cdot k_{32}}{(k_{22r} \cdot k_{29} + k_{23} \cdot k_{31}) \cdot k_{32}}; \\C3^* &= \frac{k_{22r} \cdot k_{23} \cdot k_{30} \cdot k_{31} + k_{22r} \cdot k_{29} \cdot k_{31r} \cdot k_{32}}{k_{23} \cdot k_{29} (k_{22} \cdot k_{30} + k_{31r} \cdot k_{32})}; \\C8^* &= \frac{-k_{22r} \cdot k_{23} \cdot k_{30} \cdot k_{31} + k_{22r} \cdot k_{29} \cdot k_{31r} \cdot k_{32}}{k_{30} (k_{22r} \cdot k_{29} + k_{23} \cdot k_{31}) \cdot k_{32}};\end{aligned}$$

El valor de b_0 correspondiente a este estado estacionario es:

$$b_0 = -k_{22} \cdot k_{23} \cdot k_{30} \cdot k_{31} + k_{22r} \cdot k_{29} \cdot k_{31r} \cdot k_{32}$$

Como los valores de b_0 encontrados para los dos estados estacionarios son iguales y opuestos, no pueden ser ambos simultáneamente positivos, por lo que ambos estados estacionarios no pueden ser simultáneamente estables. Por lo tanto, se deduce que el sistema puede tener un estado estable y uno

inestable, por lo que no puede exhibir biestabilidad. En la figura 24 se ejemplifica este tipo de comportamiento.

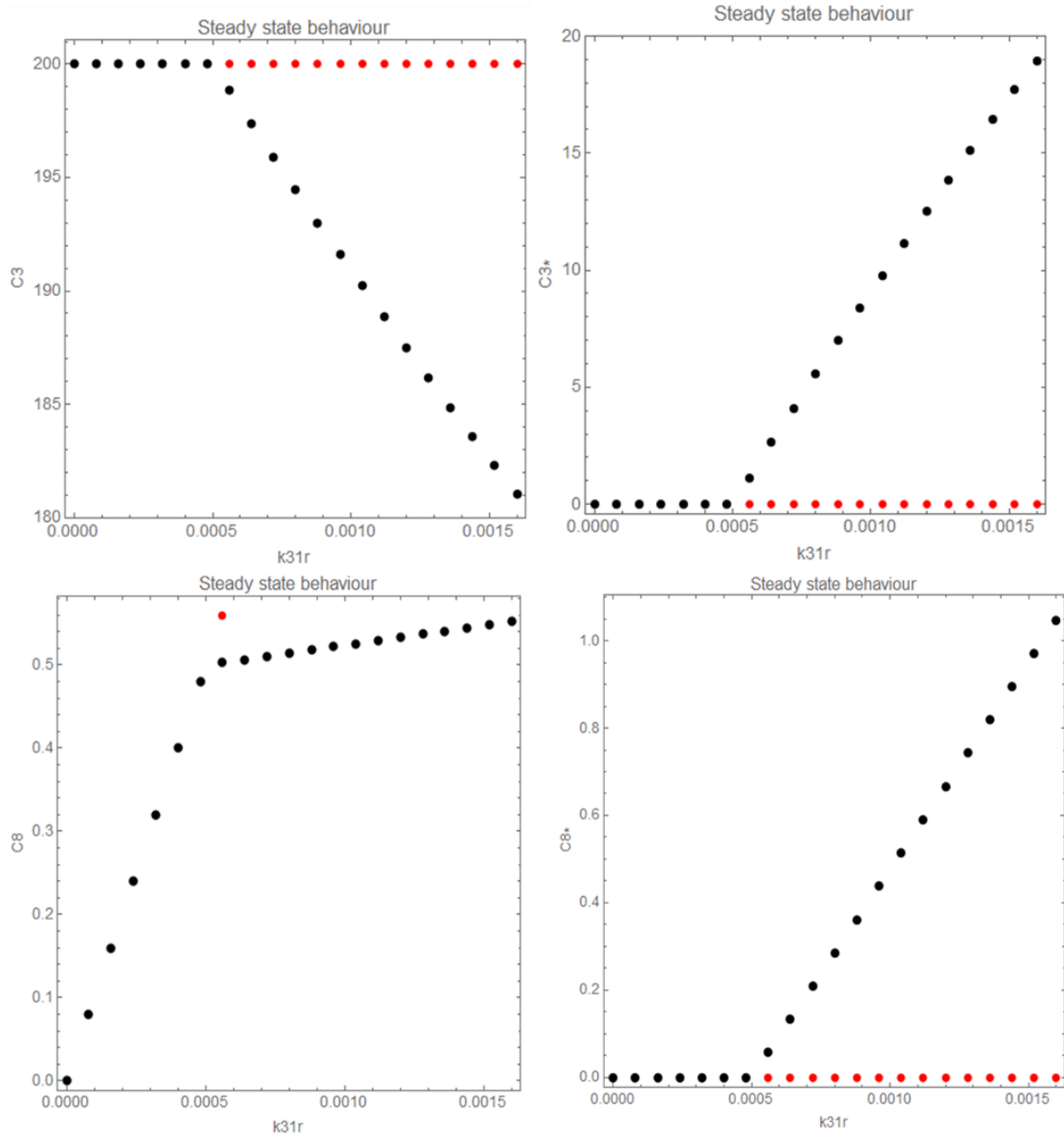


Figura 24: Diagrama de bifurcación para el modelo reducido de la vía extrínseca de la apoptosis, con leyes de acción de masas. A la derecha se observa la variación de $C3$ y a la izquierda la de $C3^*$ utilizando como parámetro de bifurcación k_{31r} . Se puede ver claramente que existen valores de k_{31r} para los cuales hay un estado estable (puntos negros) y uno inestable (puntos rojos). Los valores de parámetros utilizados fueron: $k_{22} = 1/1000$; $k_{22r} = 1/5$; $k_{23} = 1/1000$; $k_{29} = 1/10000$; $k_{30} = 1/1000$; $k_{31} = 1/1000$; $k_{32} = 1/10000$;

Sin embargo, al utilizar leyes de velocidad para v_{29} y v_{32} , donde las concentraciones del activador están elevadas al cuadrado:

$$v_{22} = k_{-22} - k_{22} \cdot C3$$

$$v_{23} = k_{23} \cdot C3^*$$

$$v_{29} = k_{29} \cdot C8 \cdot (C3^*)^2$$

$$v_{30} = k_{30} \cdot C8^*$$

$$v_{31} = k_{-31} - k_{31} \cdot C8$$

$$v_{32} = k_{32} \cdot C3 \cdot (C8^*)^2$$

se ve que el sistema es capaz de presentar hasta cinco estados estacionarios, aunque no todos ellos físicamente posibles. En particular, en las simulaciones numéricas realizadas, se obtuvo un máximo de tres estados estacionarios para los distintos valores de parámetros empleados (Figuras 25 y 26). Se evidenciaron dos casos posibles: el primero con un único estado estable y dos estados inestables (Figura 25), mientras en el segundo se obtuvieron dos estados estables separados por uno inestable, es decir, biestabilidad. Además, al disminuir varios órdenes de magnitud el valor de los parámetros, se obtuvo que el sistema puede ser biestable, no evidenciándose que para algunos valores de k_{31r} haya dos estados inestables (Figura 26).

En resumen, para leyes de velocidad con términos donde hay concentraciones que están elevadas al cuadrado, se encuentra que el sistema puede ser biestable para un conjunto dado de valores de parámetros. Esto contrasta con el modelo completo [33], donde las inhibiciones de IAP y BAR permiten que se encuentre biestabilidad usando exclusivamente leyes de acción de masas.

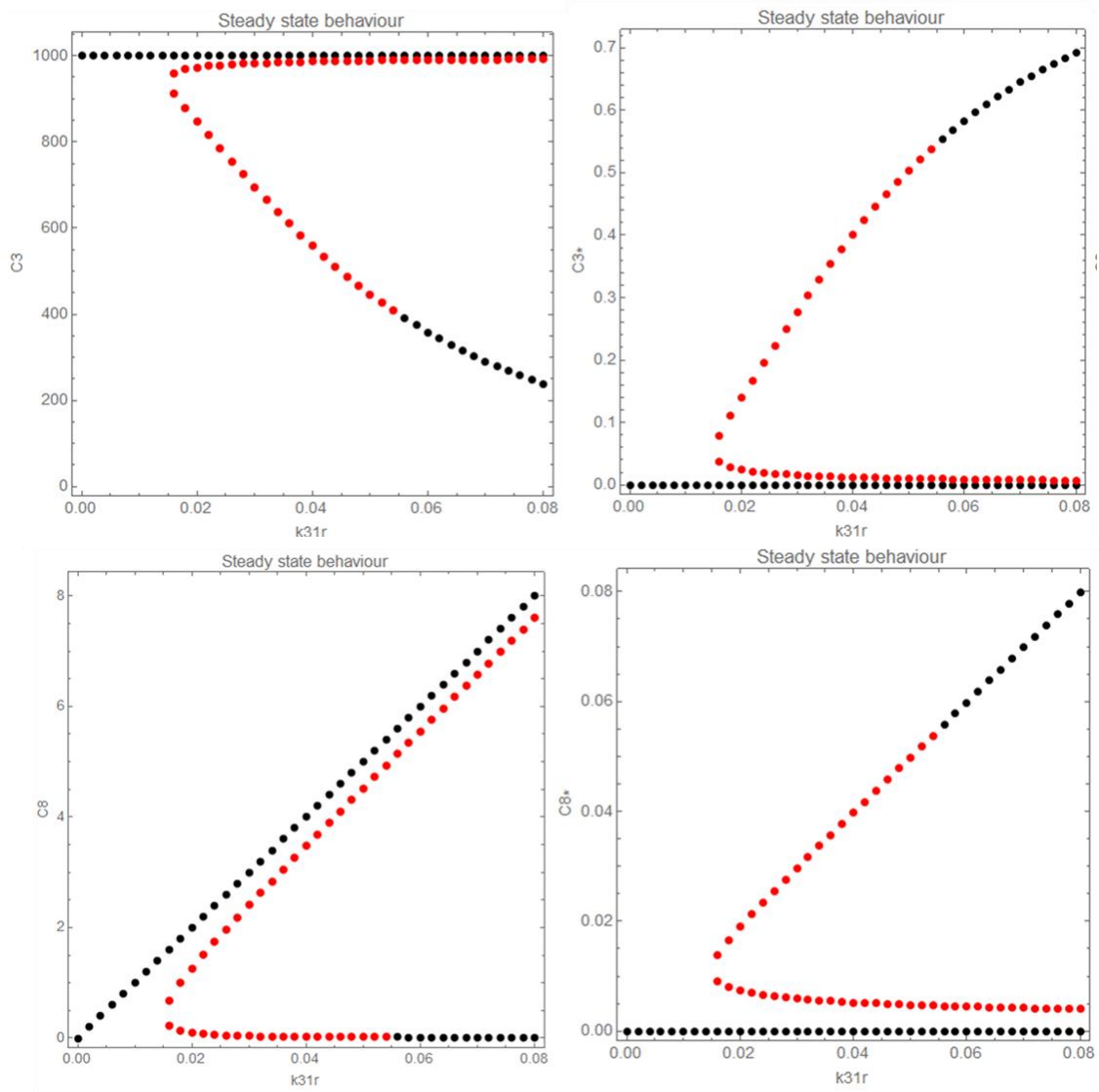


Figura 25: Diagrama de bifurcación para el modelo reducido de la vía extrínseca de la apoptosis. A la derecha se observa la variación de C_3 y C_8 , y a la izquierda la de C_3^* y C_8^* utilizando como parámetro de bifurcación k_{31r} . Se puede ver claramente que existen valores de k_{31r} para los cuales hay un estado estable y dos inestables, mientras para otros se observa biestabilidad. Los valores de parámetros utilizados fueron: $k_{22} = 1/100$; $k_{22r} = 10$; $k_{23} = 11$; $k_{29} = 10$; $k_{30} = 1$; $k_{31} = 1/100$; $k_{32} = 5$.

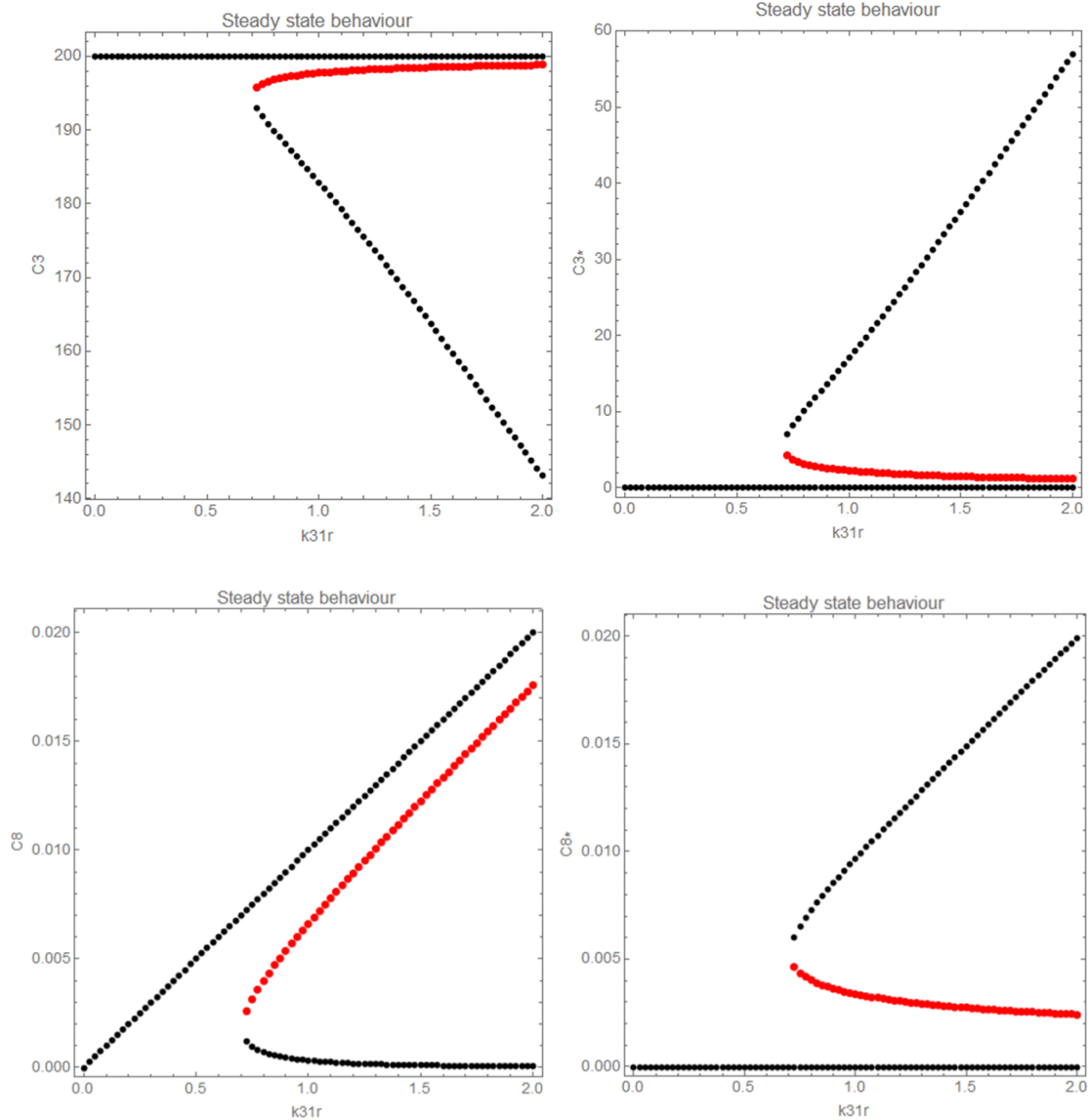


Figura 26: Diagrama de bifurcación para el modelo reducido de la vía intrínseca de la apoptosis. A la derecha se observa la variación de $C3$ y $C8$, y a la izquierda la de $C3^*$ y $C8^*$ utilizando como parámetro de bifurcación k_{31r} . Se puede ver claramente que en todo el rango donde hay tres estados estacionarios se observa biestabilidad. Los valores de parámetros utilizados fueron: $k_{22} = 1/1000$; $k_{22r} = 1/5$; $k_{23} = 1/1000$; $k_{29} = 1/10000$; $k_{30} = 1/1000$; $k_{31} = 1/1000$; $k_{32} = 1/10000$.

3.2.5. Combinación de los modelos reducidos de la vía intrínseca y extrínseca

En función de los resultados obtenidos, surgió la pregunta de si existía alguna forma de modificar el modelo reducido de la vía intrínseca, que no fuera la incorporación de XIAP u otro inhibidor, que permitiera recuperar la biestabilidad al modelo.

Dado que se había encontrado que el esquema reducido de la vía extrínseca era capaz de generar biestabilidad para leyes de velocidad donde

las concentraciones de activadores están elevadas al cuadrado, se intentó determinar si al combinarlo con el modelo reducido de vía intrínseca (Modelo [34] sin X), este era capaz de hacer que el sistema presentara biestabilidad.

Al hacer el análisis del modelo combinado, se obtuvo que el modelo era capaz de mostrar comportamiento biestable para cierto valor de parámetros (Figura 27). Esto implica que el sistema puede exhibir comportamiento biestable si se utilizan algunas leyes de velocidad con concentraciones elevadas al cuadrado en el módulo correspondiente a la vía extrínseca. Recordar que no se pudo encontrar biestabilidad al modificar las leyes de velocidad de la vía intrínseca. Además, para lograr observar biestabilidad, notar que debieron aumentarse sensiblemente los valores de los parámetros del módulo de la vía extrínseca en relación a los utilizados en el modelo reducido de la misma, estudiado aisladamente.

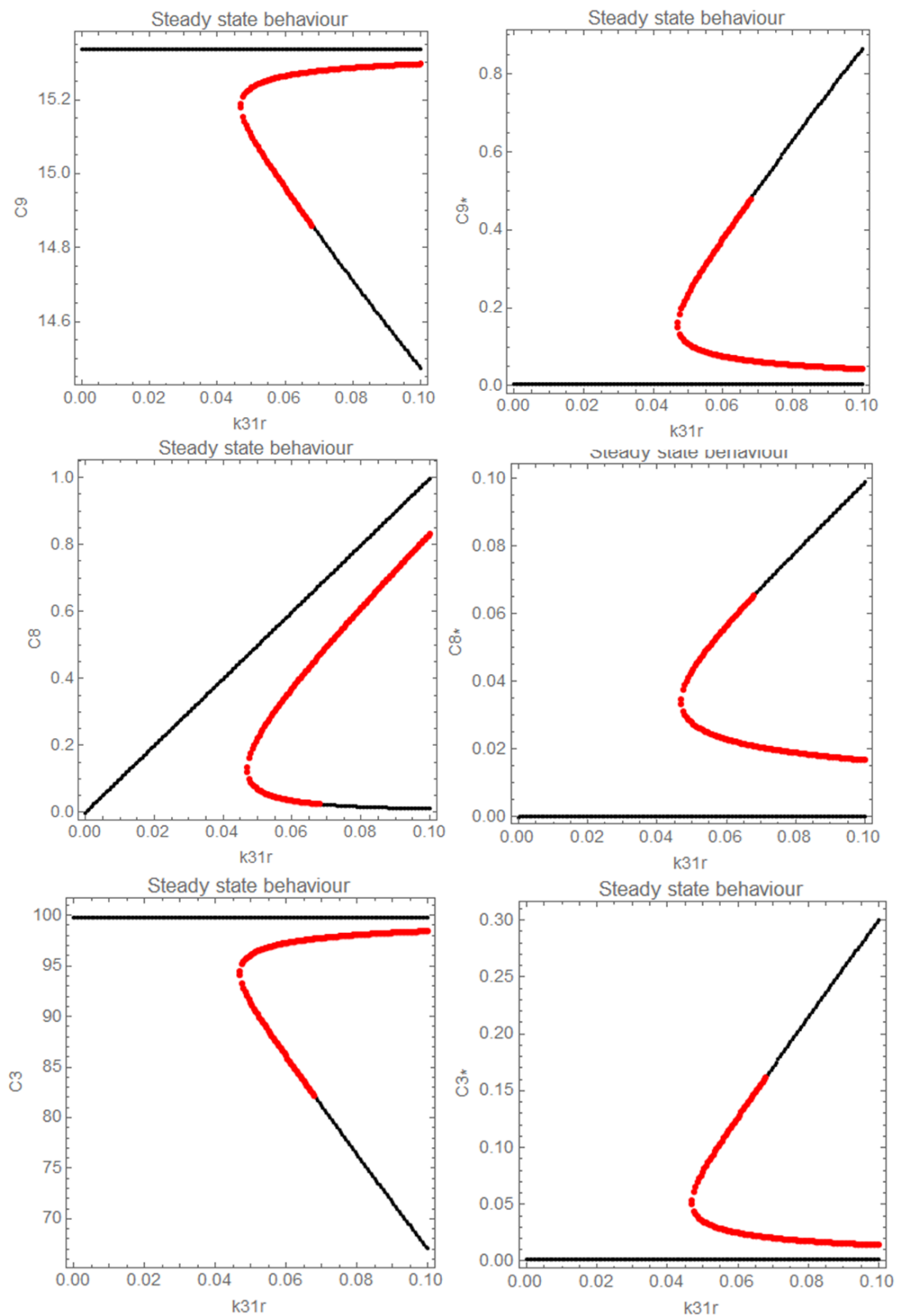


Figura 27: Diagramas de bifurcación para las especies representadas en el modelo reducido de la vía intrínseca incorporando C8. Se utilizaron los valores reportados en la bibliografía [34,] excepto para: $k_{22} = 1$; $k_{22r} = 100$; $k_{23} = 110$; $k_{29} = 100$; $k_{30} = 1$; $k_{31} = 1/10$; $k_{32} = 50$.

4. Conclusiones

Al estudiar un modelo metabólico de prueba, se aplicaron los métodos de análisis elegidos, lográndose verificar que éste es capaz de exhibir biestabilidad. El análisis de amplitud del rango de biestabilidad determinó que ésta varía notoriamente según el parámetro analizado. Por ejemplo, se obtuvo que a partir de cierto nivel de cooperatividad, el sistema siempre es biestable si el resto de los parámetros presentan valores adecuados, mientras que para otros parámetros la amplitud llega a un máximo y luego cae, en algunos casos hasta hacerse cero.

Se reprodujeron satisfactoriamente los resultados obtenidos en [33] y [34], para los modelos de las vías extrínseca e intrínseca de activación de la apoptosis, confirmándose en ambos casos que el sistema presenta comportamiento biestable para las leyes de velocidad y parámetros reportados.

A su vez, se estudió un modelo reducido (sin la inhibición por XIAP) para la activación de la vía intrínseca, pero no se observó biestabilidad para ninguna de las leyes de velocidad ni parámetros ensayados. A pesar de que el sistema reducido contaba con cuatro feedback positivos, esto no fue suficiente para producir biestabilidad.

También se estudió un modelo reducido para la activación de la vía extrínseca de la apoptosis (sin inhibición por IAP y BAR). No se observó biestabilidad para las leyes de velocidad de acción de masas, encontrándose de manera analítica que el modelo reducido de la vía extrínseca, solo puede tener dos estados estacionarios, uno estable y uno inestable.

Sin embargo, al utilizar leyes de velocidad con las concentraciones de los activadores elevadas al cuadrado, se observó que el sistema puede presentar dos comportamientos posibles en función de los parámetros. Para algunos valores de las constantes cinéticas el sistema presenta tanto biestabilidad como un estado estable y dos inestables. Pero al usar otros valores de constantes cinéticas, no se obtiene un estado estable y dos inestables, observando sólo biestabilidad.

Finalmente, al combinar los modelos reducidos de la vía intrínseca y extrínseca, se obtuvo biestabilidad sin necesidad de utilizar inhibidores, pero debió introducirse leyes de velocidad elevadas al cuadrado en la porción del modelo correspondiente a la vía extrínseca. En otras palabras, se logró que el sistema presentara dos estados estables, uno con baja y alta concentración de $C3^*$ sin la necesidad de incluir reguladores negativos, pero de todas maneras fue necesario agregar no linealidad al sistema para recuperar la biestabilidad.

5. Bibliografía

- [1] Schleich K, Larvik I: Mathematical modeling of apoptosis. *Cell Communication & Signals* 2013, 11:44.
- [2] Ozbudak E M, Thattai M, Lim H N, Shraiman B I, van Oudenaarden A: Multistability in the lactose utilization network of *Escherichia coli*. *Nature* 2004, Vol 427, pp 737-740.
- [3] Mosca E, Barcella M, Alfieri R, Bevilacqua A, Canti G, Milanese L: Systems biology of the metabolic network regulated by the Akt pathway. *Biotechnology Advances* 2012, Vol 30: pp 131-141
- [4] Kirk P, Throne T, Stumpf M: Model selection in systems and synthetic biology. *Current opinion in biotechnology* 2013, Vol 24: pp 767-774.
- [5] Zhou H X, Rivas G, Minton A P: Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu Rev Biophysics* 2008, Vol 37: pp 375–397
- [6] Wilhelm T: Analysis of structures causing instabilities. *Physical Review* 2007, E76 01911.
- [7] Kolch W, Calder M, Gilert D: When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signaling. *FEBS Letters* 2005, Vol 579: pp1891-1895
- [8] Markevich N I, Hock J B, Kholodenko B N: Signaling switches and bistability arising from multisite phosphorylation in protein kinase cascade. *The Journal of Cell Biology* 2004, Vol 164, Num 3: pp 353-359.
- [9] Huang C Y, Ferrel J E: Ultrasensitivity in the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades. *PNAS* 1996, Vol 93: pp 10078-10083.
- [10] Liang Q, Nachbar R B, Kevrekidis I G, Shvartsman S Y: Bistability and Oscillations in the Huang-Ferrel Model of MAPK Signaling. *PLoS Computational Biology* 2007, 3: e184.
- [11] Mulukutla B, Yongky A, Daoutidis P, Hu W: Bistability in glycolysis pathway as a physiological switch in energy metabolism. *PLoS ONE* 2014, Vol 9.: Issue 6 , e98756.
- [12] Shestov A, Liu X, Ser Z, Cluntun A, Hung Y, Huang L, Kim D, Le A, Yellen G, Albeck J, Locasale J: Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *eLife* 2014, 3:e03342
- [13] Piedrafita. G, Montero. F, Morán.F, Cárdenas. M, Cornish-Bowden. A: A Simple Self-Maintaining Metabolic System: Robustness, Autocatalysis, Bistability. *PLoS Computational Biology* 2010, 6(8): e1000872
- [14] Mincheva M, Craciun G: Multigraph Conditions for Multistability, Oscillations and Pattern Formation in Biochemical reaction Networks. *Proceedings of the IEEE* 2008. Vol 96, Num 8: pp 1281-1288.

- [15] Hyung-Seok Choi, Soohye Han, Hiroki Yokota, Kwan-Hyun Cho: Coupled positive feedbacks provoke slow induction plus fast switching in apoptosis. *FEBS Letters* 2007, Vol 581: pp 2684-2690.
- [16] Herrero I, Miras-Portugal T, Sánchez J: Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic presynaptic receptor stimulation. *Letters to Nature* 1992, Vol 360: pp163-166.
- [17] Hamid Reza Noori: *Hysteresis phenomena in biology* 2014. Springer.
- [18] Xiong W, Ferrell J E: A positive-feedback-based bistable 'memory module' that governs a cell fate decision. *Nature* 2003, Vol 426: pp 460-464
- [19] Chen H, Fink G R: Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & Development* 2006, Vol 20: pp 1150-1161.
- [20] Larvik I N, Samsonova M G: *The Systems Biology of Signaling Pathways*. *Cell Biophysics* 2016, Vol 61, Num 1: pp 93-101
- [21] Readman M C, Schliemann M, Kalamatianos D, Bullinger E: A feedback control perspective on models of apoptosis signal transduction. *Chaos, Solitons & Fractals* 2013, Vol 50: pp 93-99.
- [22] Veening J W, Smits W K, Kuipers O P: Bistability, Epigenetics, and Bet-Hedging in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2008, Vol 62, pp 193-210
- [23] Bagowski C P, Ferrell J E Jr.: Bistability in the JNK cascade. *Current biology* 2001, Vol 11: pp 1176–1182
- [24] Eißing T, Waldherr S, Allgöwer F, Scheurich P, Bullinger E: Steady state and (bi-) stability evaluation of simple protease signaling networks. *BioSystems* 2007. Vol 90: pp 591-601
- [25] Bialik S, Zalckvae E, Ber Y, Rubinstein A D, Kimchi.A: Systems biology of programmed cell death. *Cell Press, Trends in Biochemical Sciences* 2010, Vol 35: pp 556-564.
- [26] Elmore S: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 2007, Vol 35: 495-516.
- [27] Wajant H: The Fas signaling pathway: More Than Paradigm. *Science* 2002, Vol 296: Issue 5573.
- [28] Jiang X, Wang X: Cytochrome C-Mediated Apoptosis. *Annual Reviews of Biochemisyttry* 2004, Vol 73: pp 87-106
- [29] Wyllie A H: "Where, O Death, Is Thy Sting?" A Brief Review of Apoptosis Biology. *Molecular Neurobiology* 2010, Vol 42: pp 4-9
- [30] Creagh E M, Conroy H, Martin S.J: Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Inmunological Reviews* 2003, Vol 193: pp 10-21.

- [31] van Engeland M, Nieland L J W, Ramaekers F C S, Schutte B, Reutelingsperger C P M: Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry* 1998, Vol 31: pp 1–9 .
- [32] Bentele I, Lavrik I, Ulrich M, Stößer S, Heermann D W, Kalthoff H, Krammer P H, Eils R: Mathematical modeling reveals threshold mechanism in CD95-induced apoptosis. *Journal of Cell Biology* 2004, Vol 166, Num 6, pp 839-851.
- [33] Eissing T, Conzelmann H, Gillessen E. D, Allogöwer F, Bullinger E, Scheurich P: Bistability analyses of a Caspase activation Model for Receptor Induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 2004, Vol 279, Num 35: pp 36892-36897
- [34] Legewie S, Blüthgen N, Herzog H: Mathematical Modeling Identifies Inhibitors of Apoptosis as Mediators of Positive feedback and Bistability. *PLoS Computational Biology* 2006, 2(9): e120
- [35] Ho K L, Harrington H A: Bistability in Apoptosis by Receptor Clustering. *PLoS Computational biology* 2010. Vol 6, Issue 10, e1000956
- [36] Kallenberger S, Legewie S (2012) Modeling Formalisms in Systems biology of Apoptosis in *Systems Biology of Apoptosis*, Chapter 1, pp 1-32 (Lavrik I, editor) Springer
- [37] Falschlehner C, Boutros M (2012) Genomic and Genetic Dissection of apoptosis signaling in *Systems Biology of Apoptosis*, Chapter 9, pp 181-197. (Lavrik I, editor) Springer.
- [38] Reinhart Heinrich, Stefan Chuster: The regulation of cellular systems, 1996. 1st Edition. Chapman & Hall (pp 38-52).
- [39] Ortega. F, Garcés. J, Mas. F Kholodenko, B. N, Cascante. M: Bistability from double phosphorylation in signal Transduction. Kinetic and structural requirements. *The FEBS Journal* 2006, Vol 273: pp 3915–3926.