

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

“Estudio sistémico de la dinámica del punto de no retorno en la Apoptosis”

Opción Biofísica

Lic. Alejandra Rojas López

Director: Dr. Luis Acerenza

Codirector: Dr. Ing. Pablo Monzón

Resumen

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular estrictamente regulado, que permite que las células mueran en respuesta a diferentes estímulos de manera organizada. El proceso se basa en la activación de una cascada de proteasas, llamadas caspasas, que se encargan de ejecutar el programa de muerte.

El principal objetivo del trabajo fue estudiar el punto de no retorno de la apoptosis y tratar de determinar en qué condiciones el proceso puede ser reversible o irreversible.

Para ello, se emplearon modelos de ecuaciones diferenciales. Se utilizó como base un modelo de vía intrínseca de la apoptosis que presenta biestabilidad, publicado en la literatura. A este se le añadió un bloque que incluye los aspectos básicos de activación de la vía mitocondrial, como por ejemplo la liberación del citocromo C de la mitocondria, obteniéndose un modelo de apoptosis extendida. El análisis de los estados estacionarios de este modelo, utilizando la concentración de BAK como parámetro de bifurcación, mostró que la activación de la apoptosis es biestable e irreversible.

Se realizó un estudio exhaustivo de la sensibilidad del comportamiento biestable e irreversible al cambio en los parámetros del sistema. La mayor sensibilidad se encuentra en las tasas de síntesis de las caspasas 3 y 9, y de XIAP. Para los tres parámetros, existe un rango en el que hay biestabilidad, pero variaciones relativamente pequeñas del parámetro permiten pasar de este comportamiento a un régimen donde la apoptosis no se activa o donde se activa irreversiblemente.

En base a estos resultados, se decidió incorporar la regulación de la apoptosis a nivel transcripcional. En particular se añadió el efecto del factor de transcripción E2F, que regula directamente la tasa de transcripción de las caspasas 3 y 9, y Apaf-1. Además, E2F tiene un efecto de activación indirecta sobre BAK. En el análisis de estados estacionarios, se encontró que el efecto principal de E2F se da a través de la modificación de la tasa de síntesis de caspasa 3. Variaciones razonables de la cantidad de E2F permiten que la apoptosis se active o no, que sea reversible o inevitable.

Por otro lado, se realizaron simulaciones temporales, utilizando diferentes tipos de estímulos para obtener información sobre la dinámica de activación de la apoptosis. Primero, tenemos que BAK por sí mismo no es capaz de desencadenar la apoptosis sin la acción de E2F sobre las tasas de síntesis, a menos que las especies activadoras derivadas de C9 se encuentren presentes en concentraciones apreciables. Por otro lado, utilizando pulsos de E2F de diferente duración e intensidad, se encontró que el tiempo necesario para la activación y la concentración de caspasa 3 activa máxima alcanzada dependen de la intensidad del estímulo. A su vez, esta concentración cae abruptamente a cero una vez removido el estímulo que le dio origen.

En resumen, en base a los estudios de estado estacionario y los cursos temporales de este modelo, los resultados parecen indicar que la apoptosis puede ser reversible o irreversible dependiendo del contexto en el que se active (factores de transcripción presentes, tiempo de activación, etc.). Además, vemos que, si bien hay diversas interacciones regulatorias, lo que tiene un mayor efecto en el comportamiento del sistema es la modulación de la tasa de síntesis de caspasa 3. Este resultado nos muestra que una forma eficiente de modular el nivel de activación de la apoptosis es efectivamente regular la cantidad de caspasa 3 disponible para activarse, que es la principal ejecutora del programa de muerte.

ÍNDICE

1) Marco teórico-----	4
1.1) Introducción-----	4
1.2) Mecanismos de Activación-----	4
1.3) Punto de no retorno-----	8
1.4) Interacción entre el metabolismo y la apoptosis-----	10
1.5) Apoptosis vs Anastasis-----	11
1.6) Regulación transcripcional de la apoptosis-----	13
1.7) Modelos matemáticos de Apoptosis-----	15
1.8) Modelo de la vía intrínseca de la apoptosis de Legewie et al.-----	21
1.9) Modelo de la glicólisis de Mulukutla et al.-----	22
2) Métodos y procedimientos-----	23
3) Resultados y discusión-----	25
3.1) Modelos utilizados-----	25
3.1.1) Verificación de resultados del modelo de Legewie et al.-----	25
3.1.2) Módulo de activación-----	26
3.1.3) Modelo de Apoptosis Extendida-----	27
3.1.4) Verificación de resultados del modelo de glicólisis de Mulukutla et al.---	27
3.1.5) Modelo integrado Apoptosis Metabolismo-----	28
3.2) Análisis de estados estacionarios y estabilidad-----	28
3.2.1) Módulo de Activación -----	28
3.2.2) Apoptosis Extendida (en función de BAK y A^{*tot})-----	29
3.2.3) Simplificación del modelo de Glicólisis reducido-----	31
3.2.4) Modelo integrado-----	32
3.3) Estudio de la irreversibilidad de la apoptosis-----	35
3.3.1) Modelo de Legewie et al.-----	35
3.3.2) Parámetros que al aumentar su valor presentan un único estado estacionario de alto valor de $C3^*$ para $A^{*tot} = 0$ -----	36
3.3.3) Parámetros que al disminuir su valor presentan un único estado estacionario de bajo valor de $C3^*$ para $A^{*tot} = 0$ -----	37

3.3.4) Parámetros que al aumentar su valor presentan un único estado estacionario de bajo valor de $C3^* A^*_{tot} = 0$ -----	39
3.3.5) Parámetros para los cuales tanto para valores altos y bajos, el sistema presenta un único estado estacionario de $C3^* A^*_{tot} = 0$ -----	40
3.3.6) Modelo de Apoptosis extendida-----	41
3.3.7) Análisis de cursos temporales-----	42
3.4) Regulación transcripcional vía E2F-----	44
3.4.1) Efecto de E2F sobre la síntesis de elementos de la apoptosis-----	44
3.4.2) Activación de BAK-----	47
3.4.3) Regulación doble de E2F sobre los componentes de la apoptosis -----	48
3.5) Simulación de dinámicas temporales-----	49
3.5.1) Apoptosis Extendida- BAK como parámetro-----	50
3.5.2) Apoptosis extendida-BAK modulado por E2F-----	53
3.5.3) Apoptosis extendida-Regulación de la síntesis de caspasas por E2F-----	56
3.5.4) Apoptosis extendida-Regulación completa vía E2F-----	58
3.5.5) Utilización de pulsos de E2F-----	59
3.6) Estudio del módulo mínimo de activación de caspasa 3-----	64
4) Conclusiones-----	66
5) Perspectivas-----	70
6) Bibliografía-----	71
7) Anexos-----	76
7.1) Leyes de velocidad y ecuaciones diferenciales-----	76
7.2) Valores por defecto de los parámetros-----	82
7.3) Glosario-----	85
7.4) Materiales utilizados-----	88
7.5) Scripts representativos-----	88

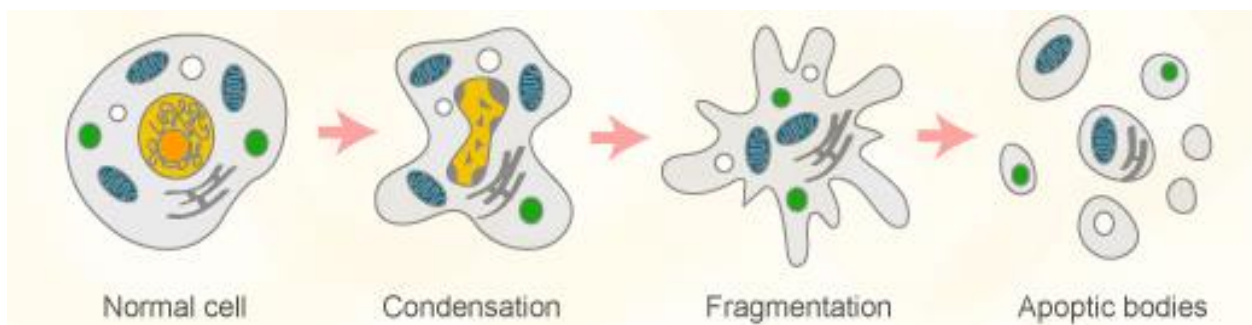
1) Marco teórico

1.1) Introducción

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada mediante el cual las células mueren de manera ordenada. El proceso es orquestado por la misma célula y permite mantener la integridad de los tejidos al eliminar células dañadas o innecesarias [1]. Si bien otros procesos de muerte como la necrosis han demostrado ser regulados [2,3], la apoptosis se caracteriza por una estricta regulación que permite degradar el contenido celular, manteniendo la integridad de la membrana. La célula se fragmenta en vesículas, denominadas cuerpos apoptóticos, que pueden ser endocitados por fagocitos del sistema inmune u otras células vecinas [4].

La apoptosis se basa en la activación una cascada de proteasas, denominadas caspasas, que tienen como efecto último el clivaje de blancos específicos que llevan a cabo la ejecución de la muerte celular. La respuesta puede desencadenarse frente a diferentes señales de estrés, como deprivación de factores de crecimiento, falta de interacción con otras células o con la matriz extracelular, citoquinas en el medio, daños en el material genético, disfunción mitocondrial, etc [5].

Independientemente del estrés, todos los mecanismos de activación convergen en la activación de la cascada de caspasas y si bien se ha comprobado que puede existir muerte celular programada caspasa independiente [6], estas son necesarias para poder observar el fenotipo apoptótico como tal (Figura 1).



*Figura 1: Esquema de los cambios fenotípicos asociados a la muerte celular por apoptosis. **Célula normal (Normal cell):** célula con su fenotipo normal, con sus organelos intactos. **Condensación (Condensation):** comienza a condensarse el material genético y a desensamblarse la envoltura nuclear. Se activan mecanismos que degradan los organelos y la maquinaria de expresión génica. **Fragmentación (Fragmentation):** se forman proyecciones en la membrana, comenzando la formación de vesículas de contenido celular. **Cuerpos apoptóticos (Apoptotic bodies):** la célula se fragmenta por completo en cuerpos apoptóticos. Imagen extraída de [7].*

1.2) Mecanismos de activación

Existen varios mecanismos de activación de la apoptosis, que se basan en la respuesta celular a “estímulos de muerte” de distinto origen (Figura 2). Las principales vías son la intrínseca, en respuesta a estrés interno, como falta de nutrientes o daño mitocondrial, y la vía extrínseca, desencadenada por señales de muerte externas mediadas por receptores de membrana.

Cabe destacar que, si bien se catalogan como vías diferenciadas de activación, tienen elementos en común y pueden retroalimentarse entre sí para desencadenar la apoptosis [8].

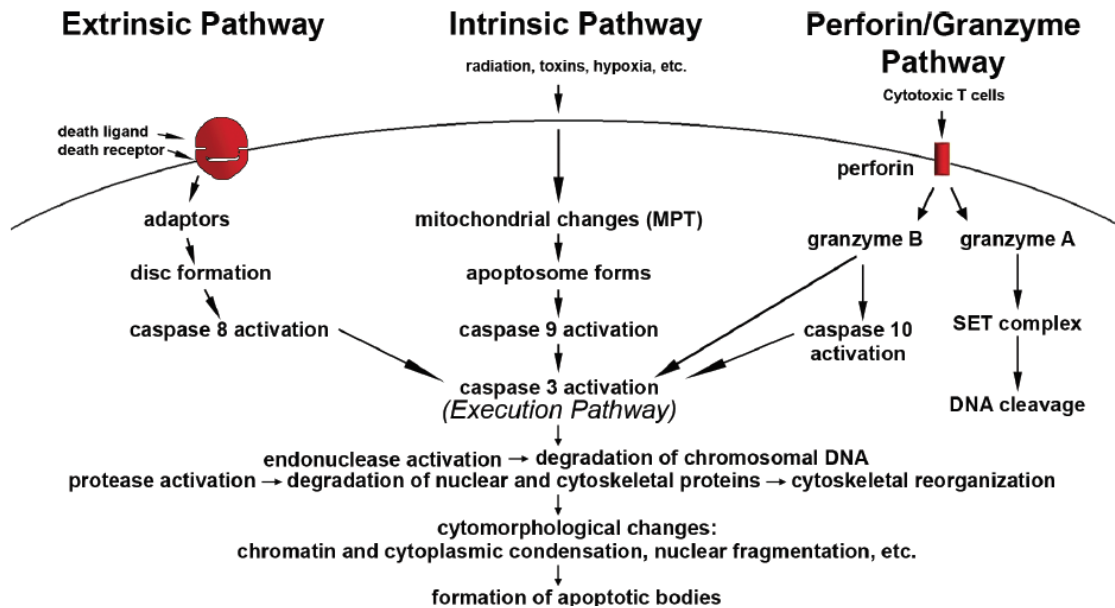


Figura 2: Resumen de los eventos más relevantes en las principales vías de activación de la apoptosis. Extraído de [1]

La vía extrínseca se define como la activación de la apoptosis por la unión de ligandos de muerte a nivel de la membrana celular, cuyo efecto está mediado por el complejo DISC (Death Inducing Signaling Complex). El esquema de esta vía puede verse en la Figura 3. La unión de un ligando como CD95L (FAS-L) desencadena la activación al unirse a su respectivo receptor. Esto causa el reclutamiento de diferentes moléculas a nivel de la membrana, entre ellas FADD (FAS Associated Death Domain), diferentes isoformas de c-FLIP (FLICE like inhibitor protein) y procaspasa 8. Este conjunto de moléculas forma al complejo denominado DISC que se encarga de conectar la señal de muerte a nivel de membrana con el citoplasma celular. La formación de este complejo permite la activación de la caspasa 8 (principal caspasa iniciadora de la vía extrínseca) que es la encargada de activar a las caspasas efectoras (3 y 7). A su vez, es capaz de clivar a la proteína Bid (produciendo t-Bid), que permite amplificar la activación por vía mitocondrial, al promover la liberación de citocromo C y por tanto la formación del Apoptosoma. El camino seguido por la célula finalmente se define por el balance entre los componentes proapoptóticos mencionados y las moléculas inhibitoras de la apoptosis. Entre estas últimas se encuentran proteínas como Bcl-2 (B cell lymphoma), XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) y la activación de vías de señalización como $\text{Nf}\kappa\text{b}$ o MAPK. Cabe destacar que la amplificación por vía mitocondrial no siempre es necesaria, clasificándose las células en tipo II o I dependiendo de si requieren esta amplificación o no [9, 10, 11, 12].

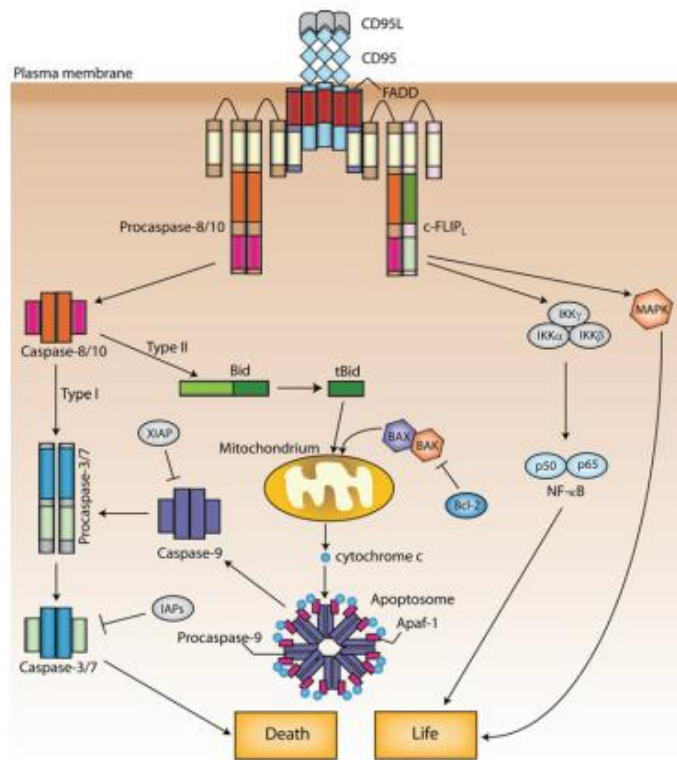


Figura 3: Esquema de la activación de la vía extrínseca de la apoptosis (ver descripción en el texto).
Extraído de [12]

Por otra parte, está la vía intrínseca de activación de la apoptosis. Se denomina de esta manera cuando la señal que da lugar al proceso de muerte es de origen interno. Los desequilibrios que pueden llevar a la activación de esta vía son múltiples y tienen diferentes niveles de regulación (Figura 4a). Por ejemplo, podemos mencionar la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la señalización por proteínas de ciclo celular como p53 frente a daño en el DNA, la señalización por Ca^{2+} y otros [13,14]. Si bien muchas veces no es del todo claro cuál es el evento inicial que marca la activación (a diferencia de en la vía extrínseca, donde es la unión del ligando), todas las señales de estrés mencionadas convergen a la liberación del citocromo C del espacio intermembrana de la mitocondria [15]. La liberación de esta proteína es muy rápida, del orden de minutos, y permite la formación del Apoptosoma. Este es un complejo formado por la proteína Apaf-1 y el citocromo C que permite el reclutamiento de la procaspasa 9 [16,17]. Este complejo utiliza ATP para generar un cambio conformacional que permite activar la caspasa 9 [18] (principal caspasa iniciadora de la vía intrínseca). A su vez, la activación de esta vía es regulada por otras proteínas pro y anti apoptóticas. De las proteínas antiapoptóticas de la familia IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins), XIAP es la que presenta el efecto inhibitor más potente [19]. XIAP es capaz de unirse a las diferentes formas de C9 y a la caspasa 3 activa, promoviendo su degradación. En oposición, tenemos a la proteína SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases), que es liberada de la mitocondria junto con el citocromo C y secuestra a XIAP, y por tanto tiene un rol proapoptótico. Este proceso puede verse esquematizado en la Figura 4b

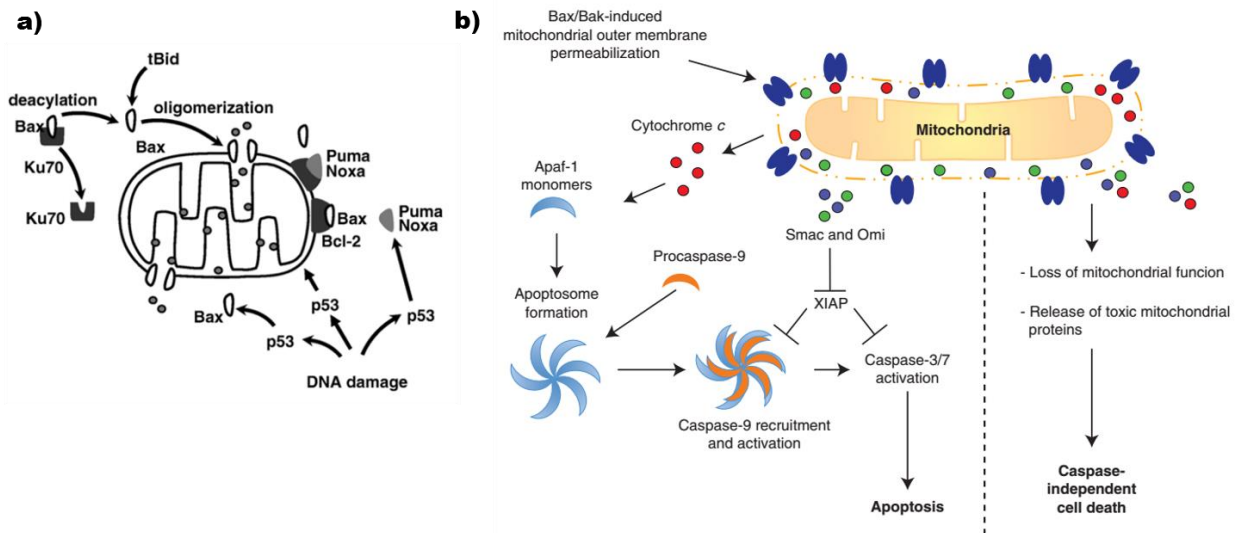


Figura 4: Esquemización de los eventos que llevan a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. a) Se observan los procesos que llevan a la permeabilización de la mitocondria y b) la cascada de caspasas asociada a la vía intrínseca que ocurre posterior a la liberación del citocromo C mitocondrial. Adaptado de [15,20].

También existen otros mecanismos menos estudiados de activación de la apoptosis, como la vía perforina-granzima y la anoikis.

La vía perforina granzima es utilizada por células citotóxicas, como las NkT o los linfocitos T CD8+ para promover la apoptosis en otras células [21]. El mecanismo consiste en la detección de determinadas señales en la membrana de la célula blanco, que indican que esta debe ser eliminada, por ejemplo, señales relacionadas con infecciones virales o transformación maligna. Entonces, las células citotóxicas forman poros en la membrana de sus blancos utilizando la proteína perforina. Esto debilita la integridad de la membrana y permite la entrada de los diferentes componentes de los gránulos citotóxicos liberados por las células citotóxicas. Entre otros, ocurre la entrada de la proteína granzima, encargada de clivar diferentes blancos celulares. Este sistema en su conjunto hace que la célula blanco muera por apoptosis [22].

Por otro lado, la anoikis es un mecanismo por el cual las células disparan un programa de muerte en respuesta a la falta de señales de interacción con la matriz extracelular. Se cree que se desencadena debido a que, la falta de interacciones con la matriz causa cambios en el citoesqueleto que liberan proteínas proapoptóticas BH3-only de la familia Bcl-2 y esto desencadenaría la muerte por una vía similar a la mitocondrial [23]. Existe evidencia que apunta a que el desarrollo de resistencia a la muerte por anoikis es clave para permitir que células cancerígenas se vuelvan invasivas [24].

Finalmente, todas las vías de activación de la apoptosis convergen hacia la vía de ejecución, que es llevada a cabo principalmente por la caspasa 3. Esta última es la responsable de activar varias proteasas y nucleasas, que efectivamente ejecutan el programa de muerte y son las responsables del fenotipo observado en las células apoptóticas (fragmentación nuclear, exposición de fosfatidilserina, protrusiones, formación de cuerpos apoptóticos, etc) [25, 26].

Dentro de los diferentes grupos de proteínas que tienen un rol regulador sobre la apoptosis, están las de la familia Bcl-2. Estas son definidas por la presencia de dominios homólogos a los de la proteína antiapoptótica Bcl-2, que le da el nombre a la familia. Estas pueden clasificarse en tres grupos principales, dependiendo de cuáles dominios poseen. Están las BH1-BH4, que son las que presentan los cuatro dominios homólogos a Bcl-2 y son proteínas inhibidoras de la apoptosis. Después tenemos a las BH1-BH3, como por ejemplo BAX (Bcl-2 Associated X protein) y BAK (Bcl-2 Antagonist Killer), que se encargan de generar poros en la membrana mitocondrial externa. Estas, por lo tanto, permiten la liberación de otras proteínas proapoptóticas (como las ya mencionadas citocromo C y SMAC). Finalmente están las proteínas BH3-only, que solo tienen uno de los dominios característicos de la familia, como PUMA, NOXA, BIM, etc [27, 28]. En general tienen roles proapoptóticos y se han propuesto varios modelos para el mecanismo de acción. Por ejemplo, se ha observado que algunas de estas proteínas BH3-only promueven la apoptosis al neutralizar proteínas antiapoptóticas (secuestrándolas). También hay algunas que tienen efecto indirecto ya que promueven que BAK y BAX se inserten en la membrana mitocondrial externa [29].

1.3) Punto de no retorno

Desde que comenzó a estudiarse la muerte celular se observó que existían determinados puntos clave en la regulación de la apoptosis, los cuales marcan etapas decisivas en el destino final de la célula [6, 30, 31]. En particular se detectó que existe un “compromiso de muerte celular” en varios tipos celulares a diferentes alturas de la vía apoptótica. En base a la evidencia disponible se ha postulado la mitocondria como el integrador de la respuesta apoptótica y, en particular, la liberación del citocromo C, como posible punto de no retorno, junto con la disrupción de la cadena respiratoria [32, 33, 34, 35].

Se han encontrado diversos mecanismos por los cuales el citocromo C llega de la mitocondria al citosol, que se relacionan con la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, tal como se aprecia en la Figura 5. Los principales mecanismos serían: la formación de poros en la membrana mitocondrial, la producción de ROS y la ruptura de la membrana por la entrada de solutos, pero no se ha logrado establecer cuál es el evento desencadenante [36].

A su vez, generó un enorme interés el por qué es precisamente la mitocondria, el organelo encargado de la regulación de la apoptosis. Los principales argumentos evolutivos se relacionan con su carácter regulador del metabolismo energético y el hecho de que podría tratarse de un vestigio de la inmunidad innata contra bacterias intracelulares (Figura 6) [37, 38]. Se especula qué ventajas puede tener este mecanismo de regulación y qué consecuencias puede tener el conservar un mecanismo agresivo latente contra un elemento de la propia célula [39].

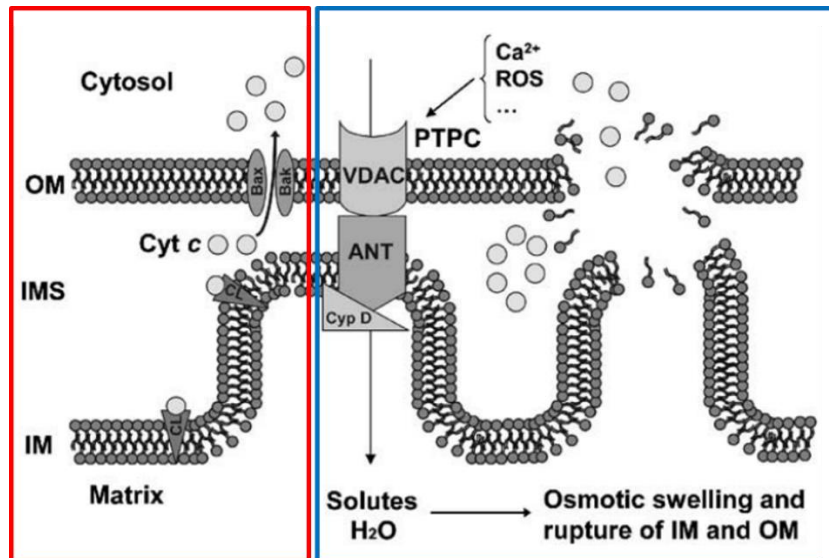


Figura 5: Resumen esquemático de los mecanismos de liberación del citocromo C mitocondrial. Pueden distinguirse dos mecanismos principales. El primer mecanismo (cuadro rojo) se caracteriza por la formación de poros en la membrana mitocondrial por las proteínas BAK y BAX. Estas se insertan en la membrana en respuesta a diferentes señales de estrés y permiten el pasaje del citocromo C hacia el citosol. Por otro lado, el segundo mecanismo (cuadro azul), se basa en la formación de complejos de membrana que permiten la entrada de solutos osmóticamente activos al espacio intermembrana de la mitocondria. Esto ocurre en respuesta al aumento del Ca^{2+} citosólico y especies reactivas del oxígeno, causando la ruptura de la membrana mitocondrial externa y permitiendo la salida del citocromo C. Adaptado de [36]

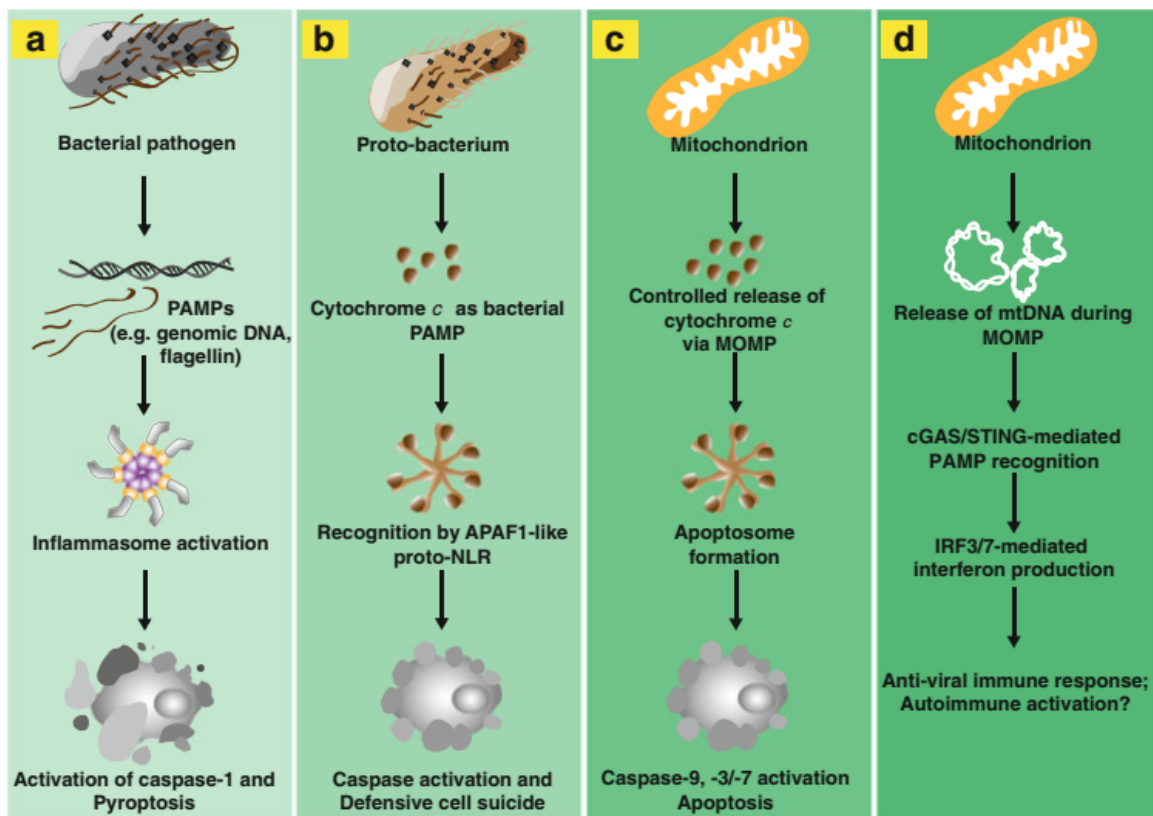


Figura 6: Esquema que muestra la analogía estructural entre la vía intrínseca de la apoptosis con elementos de la inmunidad innata contra bacterias intracelulares. (a) Se observa una esquematización de la vía de inmunidad innata para patógenos, como bacterias, que utiliza como plataforma el inflammasoma; (b) Se esquematiza la respuesta de la inmunidad innata frente a patógenos intracelulares que promueve la muerte celular de manera preventiva vía la activación de NLRs (NOD like receptors) ;

(c) Resumen de la apoptosis por vía mitocondrial, que utiliza como plataforma el apoptosoma; (d) Esquema de la respuesta mediada por interferón frente a patógenos virales. En los casos a, b y c se aprecia una cierta analogía en las estructuras utilizadas para desencadenar la respuesta. Adaptado de [38]

1.4) Interacción entre el metabolismo y la apoptosis

Existe evidencia de que hay células capaces de evadir la apoptosis en diferentes etapas. Por ejemplo, impidiendo que se generen señales proapoptóticas a nivel nuclear o de membrana, sobreexpresando genes relacionados con el crecimiento y la proliferación, bloqueando genes reguladores o inhibiendo la cascada de caspasas a diferentes niveles [24, 40, 41, 42].

En particular, desde el punto de vista metabólico, se ha encontrado que la capacidad de tener un mayor flujo de glicólisis hace que una célula tenga más probabilidades de sobrevivir frente a un estímulo de muerte [43, 44]. Este mayor flujo se ha relacionado con factores promotores de la glicólisis anaeróbica [45]. En este modo de funcionamiento, el piruvato producido por la glicólisis se transforma en lactato para permitir regenerar el NAD⁺. Si bien el rendimiento energético es mucho menor que si el flujo se dirige hacia el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, la glicólisis anaerobia permite una rápida producción de energía. Este fenómeno se observa comúnmente en células con alta demanda metabólica o en proliferación y es conocido como efecto Warburg. Este consiste en que las células utilizan glicólisis anaerobia, a pesar de que haya disponibilidad de oxígeno, para hacer frente a la alta demanda energética. El efecto Warburg ha sido enormemente estudiado en células cancerígenas ya que se ha observado que suelen presentar altos niveles de disfunción mitocondrial. Se sabe que estas células sobreviven principalmente utilizando glicólisis, aumentando su flujo por diferentes mecanismos [46].

Por otra parte, se ha observado que el ATP es necesario para desencadenar la apoptosis, ya que participa en el cambio conformacional de Apaf-1 que permite la formación del apoptosoma y la activación de la Caspasa 9. Se comprobó efectivamente que la ausencia de ATP impide la activación de las caspasas y a su vez que el complejo del apoptosoma tiene actividad ATPasa [18, 47]. Además, se ha visto que células que han iniciado la vía apoptótica pueden morir por necrosis si no tienen suficientes recursos como para llevar a cabo las etapas de la apoptosis, desde la formación del apoptosoma hasta la fragmentación nuclear.

A su vez, también la activación de la apoptosis tiene efecto sobre el metabolismo energético. Se demostró que la activación de las caspasas 9 y 3 inhibe la glicólisis. Sin embargo, no se ha encontrado que afecten los transportadores de glucosa, ni que exista clivaje proteolítico de las enzimas de la glicólisis, y no se han encontrado complejos caspasa-enzima glicolítica. Se observa inhibición de algunas de las enzimas, preferentemente de la fosfofructoquinasa 1 y la piruvato-quinasa. En suma, no se ha logrado determinar exactamente cuál es la naturaleza de la inhibición [48]

Si bien está demostrada la participación del ATP en la apoptosis, no se observa una disminución en el nivel de ATP citosólico al momento de la muerte. Dado que la activación de las caspasas inhibe la glicólisis y gran parte del citocromo C mitocondrial

se trasloca al citosol (afectando la cadena respiratoria) sería previsible que existiera una catástrofe energética, pero esta no ha sido evidenciada claramente [49].

El rol de la mitocondria en la activación de la apoptosis ya se ha mencionado anteriormente en esta introducción. Por otro lado, la disrupción de la cadena respiratoria por la salida del citocromo no es total, por lo que existe una producción mínima de ATP por fosforilación oxidativa. Además, la falta de citocromo C causa un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), que sumado a la activación de las caspasas retroalimentan la disfunción mitocondrial. En particular se ha visto que C3 es capaz de clivar los complejos 1 y 2 de la cadena respiratoria [36].

En resumen, la competencia energética o capacidad de producir energía de una célula, es un factor importante a la hora de decidir, frente a un estímulo apoptótico, si esta sobrevive, muere por apoptosis, o por necrosis [50].

1.5) Apoptosis vs anastasis

Desde hace un tiempo, se ha descrito un fenómeno conocido como “Anastasis”. Básicamente, se define como el proceso por el cual células que han activado alguna de las vías apoptóticas e incluso comenzaron a adquirir el fenotipo (Figura 7), logran revertirlo, llegando a ser indistinguibles de células sanas [51].

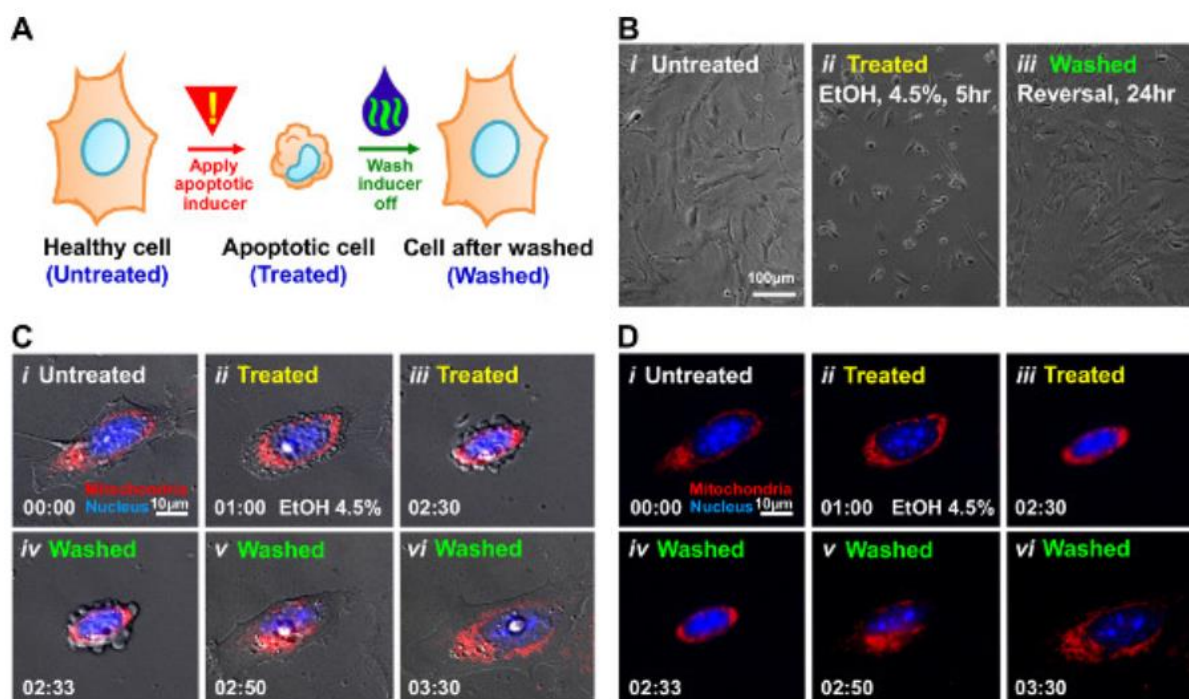


Figura 7: Proceso de anastasis [52]. **A)** Esquemización del proceso de anastasis inducido, donde se somete a una célula a un estímulo apoptótico por un tiempo determinado y luego se favorecen las condiciones de recuperación. **B)** Microfotografías de contraste de fase para la evolución de células de hígado de ratón tratadas con Etanol 4.5% durante 5hs para inducir apoptosis. Puede verse reversión del fenotipo a las 24 hs. **C)** Micrografía de contraste de fase del proceso de inducción, superpuesta a microscopía de epi-fluorescencia. El rojo marca las mitocondrias (MitoTracker) y el azul los núcleos (Hoechst stain). Puede verse como se forman las protrusiones de la membrana y se condensa el núcleo en respuesta a la inducción y como este fenotipo se revierte después del lavado. **D)** Misma imagen que en C) pero sin superponer la imagen de microscopía de contraste de fase.

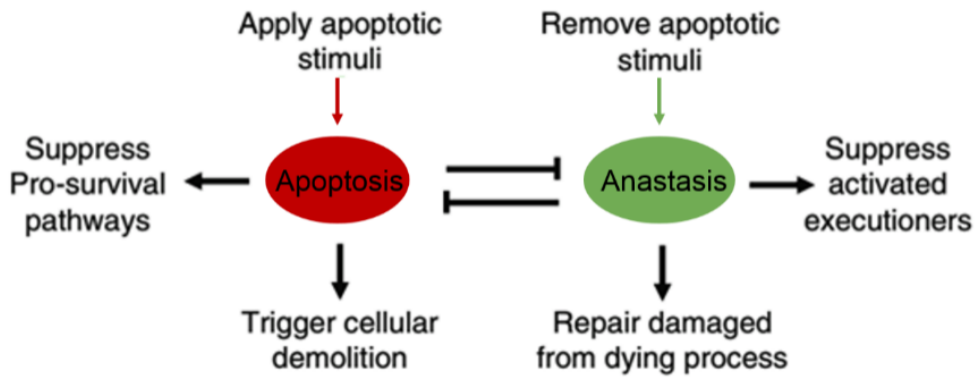


Figura 8: Resumen de la interconexión apoptosis-anastasis. Adaptado de [42]

En base a lo conocido sobre la señalización celular, se ha encontrado que en realidad incluso en momentos en los que la célula está muriendo por apoptosis, están conviviendo mecanismos de muerte y sobrevivencia. Podría pensarse que la célula, en caso de recibir la señal de detener la apoptosis, debe estar preparada para revertir la activación rápidamente. Entonces, puede decirse que lo más probable es que lo que le ocurre a la célula no sea definido necesariamente por la presencia/ausencia de elementos o vías específicas, sino que ocurre un balance cuantitativo de componentes anti y proapoptóticos y la duración de los diferentes estímulos [53]. Este concepto se ilustra en el esquema de la Figura 8.

Se ha buscado determinar si existe algún marcador molecular que permita identificar células que están en apoptosis o en diferentes etapas de recuperación o anastasis. Para ello, [54] se empezó por determinar los niveles de expresión de los genes, para evidenciar los que presentan variaciones significativas en su valor respecto a células normales. Sin embargo, no se encontraron resultados muy específicos. Si bien, se ha visto que durante la anastasis está más elevada la expresión de genes relacionados con mecanismos de reparación y señalización, lo cual parece razonable, no se encontró ninguna molécula o vía que pueda atribuirse exclusivamente al proceso de anastasis. Los autores de dicho trabajo concluyeron que las células están predispuestas para recuperarse en caso de que la señal apoptótica falle y evitar daños innecesarios. Sin embargo, no se encuentran marcadores que distingan a la anastasis de otros procesos celulares.

En otros trabajos, se ha buscado si existe alguna manera de revertir la apoptosis más allá de la permeabilización de la mitocondria, pero antes de la activación de los mecanismos efectoras. Utilizando diferentes marcadores y protocolos de citometría de flujo [55], se encontraron varias moléculas inhibitoras que no solo bloquean la muerte por apoptosis, sino que también promueven la recuperación celular. A su vez, se determinó que la autofagia celular es necesaria para obtener el efecto de protección y recuperación de las células después de un estímulo apoptótico. Una posible explicación podría ser que durante la autofagia se degradan las proteínas, permitiendo de cierta forma generar recursos para una futura recuperación rápida [56, 57].

1.6) Regulación transcripcional de la apoptosis

Existen varios estímulos y vías de señalización celulares que tienen efecto sobre la expresión de los factores involucrados en la apoptosis [58]. En general, las vías relacionadas con la regulación de la proliferación y la progresión del ciclo celular tienen una fuerte vinculación con las decisiones de muerte o supervivencia (Figura 9). A su vez, los mecanismos que regulan la apoptosis dependen del contexto celular (etapas del desarrollo, interacción con el sistema inmune, etc.) [59].

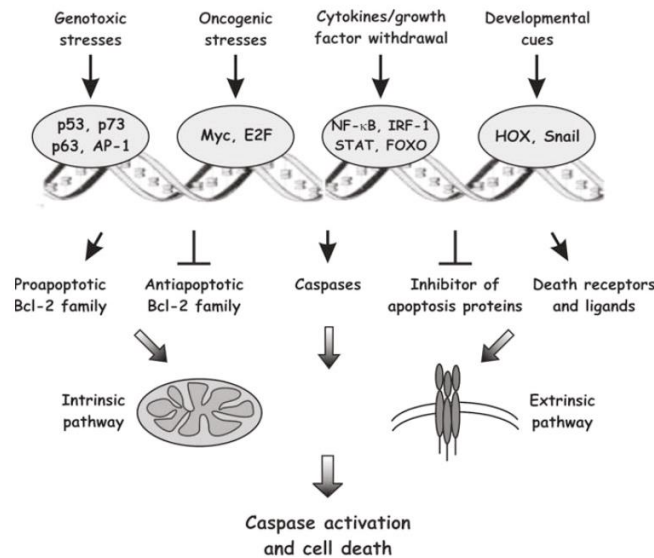


Figura 9: Resumen de los mecanismos de inducción de la apoptosis por vía intrínseca y los factores de transcripción involucrados en la señalización [58]

En particular, nos interesaremos por el factor de transcripción E2F, que fue identificado originalmente como el mediador de los efectos de la proteína viral E1A, presente en adenovirus [60]. Tiene el efecto principal de promover la proliferación, al permitir la transición de G1/S del ciclo celular. Actualmente, E2F denomina a una familia de factores de transcripción involucradas principalmente en la regulación del ciclo celular, migración, proliferación, inducción de la reparación de DNA y de la activación de la apoptosis. Su mecanismo de acción puede observarse en la Figura 10 [61, 62]. Se ha observado que durante la progresión G1/S, la aparición del complejo CiclinaD-Cdk4 fosforila el factor pRB, liberando a las isoformas de E2F que activan la transcripción (E2F1, E2F2 y E2F3) de su inhibición. A su vez, la fosforilación de p130 impide la unión del factor inhibidor de la transcripción E2F4. Todo esto permite que las formas activadoras de E2F promuevan la transcripción de proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular.

Si bien la principal función de E2F es la regulación de los check points del ciclo celular G0/G1 y G1/S, tiene dos importantes funciones en la regulación de la apoptosis. Primero, se sabe que afecta la tasa de transcripción de las caspasas 3 y 9 y de Apaf-1. Además, activa de manera indirecta el arresto celular por p53, a través de la inhibición de Mdm2 [63]. Los efectos de E2F sobre la apoptosis se resumen en la Figura 11. Actualmente, no está claro cómo se articulan las diferentes vías de señalización celular con las vías de activación de la apoptosis [64]. Sin embargo, se han hecho diferentes

experimentos que muestran que no hay una isoforma particular de E2F que se encargue de la regulación de la apoptosis. Sino más bien se relaciona con el contexto celular en el sentido más amplio.

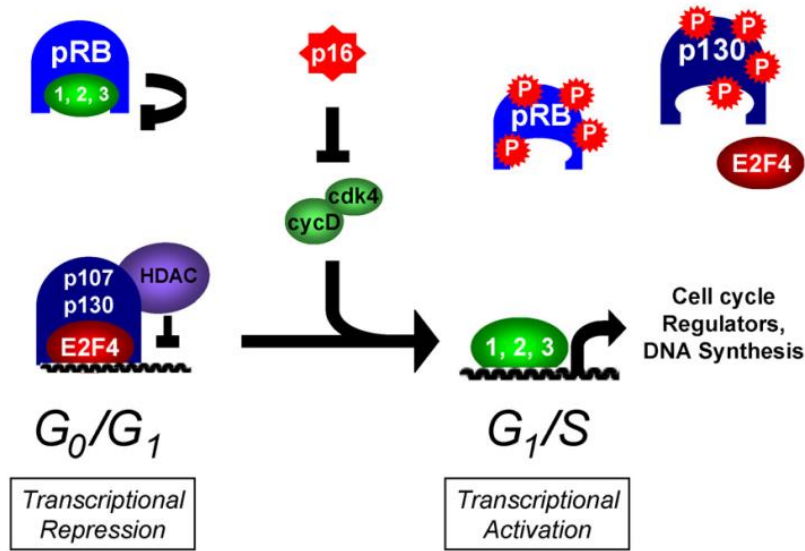


Figura 10: Mecanismo básico de funcionamiento de E2F en la regulación de la transcripción. Adaptado de [63]

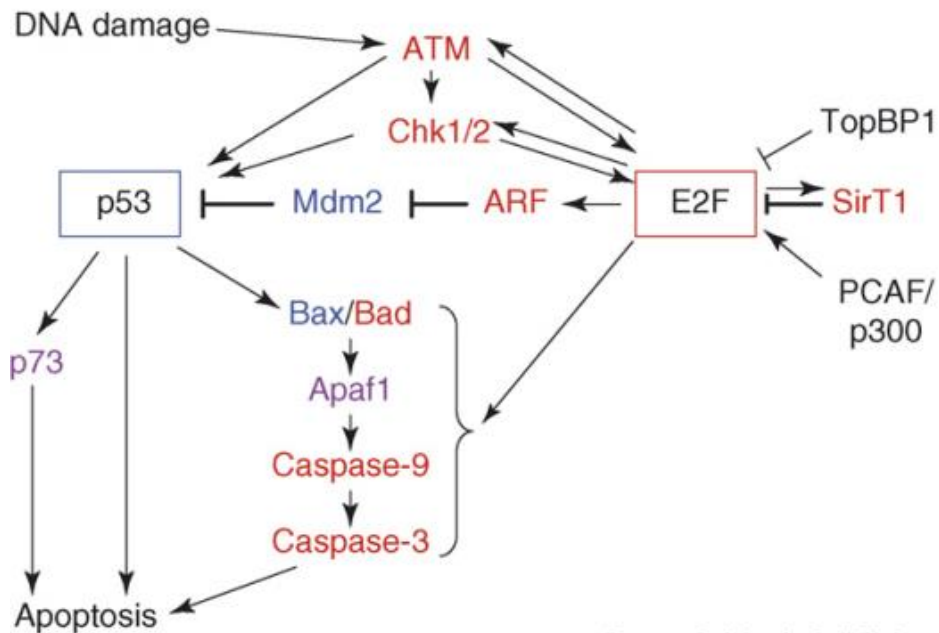


Figura 11: Resumen de los efectos transcripcionales de E2F sobre los diferentes componentes de la apoptosis. Los componentes en rojo son regulados transcripcionalmente por E2F, en azul los regulados por p53 y en violeta los regulados por ambos. Es destacable el efecto transcripcional directo de E2F sobre Apaf-1 y las caspasas 3 y 9, así como el efecto indirecto sobre p53 y por lo tanto sobre diferentes proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 [63].

1.7) Modelos matemáticos de apoptosis

En la actualidad, se ha comenzado a utilizar herramientas de modelado matemático y computacional para abordar la complejidad de los fenómenos biológicos. Estos son importantes para el estudio de la creciente cantidad de información experimental disponible, cuyo análisis muchas veces no puede hacerse solamente de manera intuitiva. Existen diferentes tipos de modelos, siendo los más utilizados los sistemas de ecuaciones diferenciales y las redes booleanas [65].

Existen varios modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias para la activación de la apoptosis, principalmente enfocados en la vía extrínseca. Por ejemplo, el modelo de Bentele et al. [66], que fue uno de los primeros en intentar explicar la ultrasensibilidad¹ en la curva de activación de la vía. En este se concluyó que las diferentes formas de c-FLIP permiten generar un umbral de concentración de ligando de muerte necesario para la activación. Por otro lado, en el trabajo de Eissing et al. [67], se describe la presencia de biestabilidad² en la activación de la apoptosis. Se determinó el espacio de parámetros para el cual este comportamiento es posible y, a pesar de que este no coincide con lo determinado experimentalmente, el modelo muestra que la estructura del sistema tiene potencialidad para generar biestabilidad. A su vez, está el modelo de Neumann et al. [68] que se centra en analizar el papel del complejo DISC en la regulación de la apoptosis. En este trabajo se concluye que la estequiometría entre las diferentes isoformas de c-FLIP es lo que determina si la célula finalmente muere o sobrevive.

Un ejemplo tipo modelo juguete utilizado en [65] consiste en un sistema de ecuaciones diferenciales que incluye los componentes elementales de la activación de la vía extrínseca de la apoptosis como puede verse en la Figura 12a. Al realizar las simulaciones temporales de los componentes del sistema, utilizando como estímulo la cantidad de ligando de muerte (L), se obtiene el resultado mostrado en la Figura 12b. Este modelo simple permite evidenciar la activación ultrasensible de la caspasa 3.

¹ La ultrasensibilidad es un comportamiento dinámico que se caracteriza por una respuesta sigmoide. Este tipo de respuesta se observa cuando la activación de una respuesta avanza lentamente hasta que se alcanza un umbral. A partir de este punto, la respuesta se desencadena rápidamente hasta llegar a un máximo y estabilizarse.

² Se dice que un sistema estacionario es biestable si presenta dos estados estacionarios estables, normalmente separados por un estado estacionario inestable.

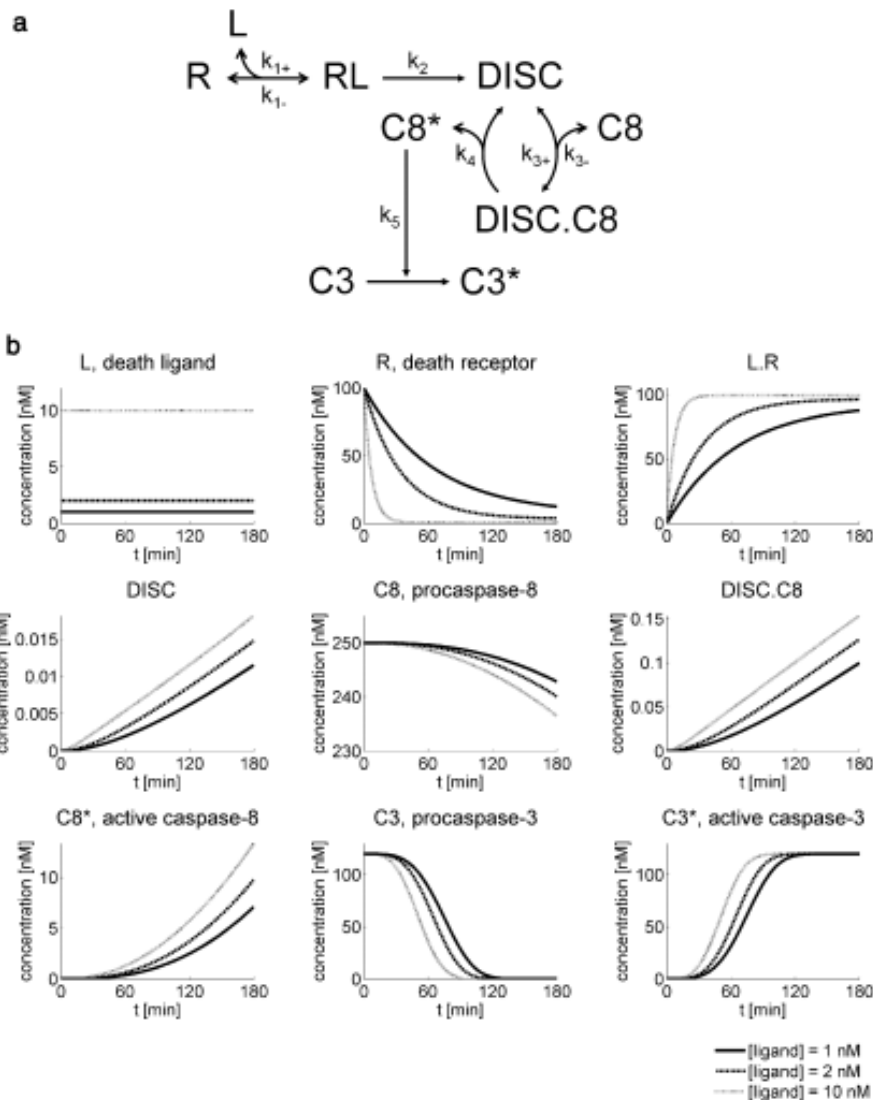


Figura 12: Análisis de modelo juguete para la activación de la vía extrínseca de la apoptosis. a) Esquema de las reacciones consideradas en el modelo, donde la entrada es la cantidad del ligando de muerte y la salida la concentración de caspasa 3 activa alcanzada. b) Simulación de cursos temporales para los diferentes componentes del sistema. Adaptado de [65]

Para la vía intrínseca de la apoptosis se han desarrollado varios modelos, aunque presentan la dificultad de que el estímulo desencadenante no está bien definido como en el caso de la vía extrínseca. Por ejemplo, el modelo de Fussenger et al. [69] sugiere que la liberación de citocromo C desde la mitocondria es un paso muy importante en la muerte por apoptosis. Por otro lado, el modelo de Stucki and Simon [70], si bien se centra en la vía extrínseca, muestra que el citocromo C es liberado en función de la intensidad del estímulo aplicado. Finalmente, dentro de los modelos de ecuaciones diferenciales, está el desarrollado por Legewie et al. [71]. Este intenta identificar qué tipos de comportamientos estacionarios es capaz de presentar el sistema. Concluyen que la presencia de lazos de retroalimentación (feedback) positiva y una doble retroalimentación negativa es lo que permite que el sistema presente biestabilidad. Además, logran obtener diferentes comportamientos dependiendo de las interacciones consideradas y los valores de parámetros utilizados (Figura 13)

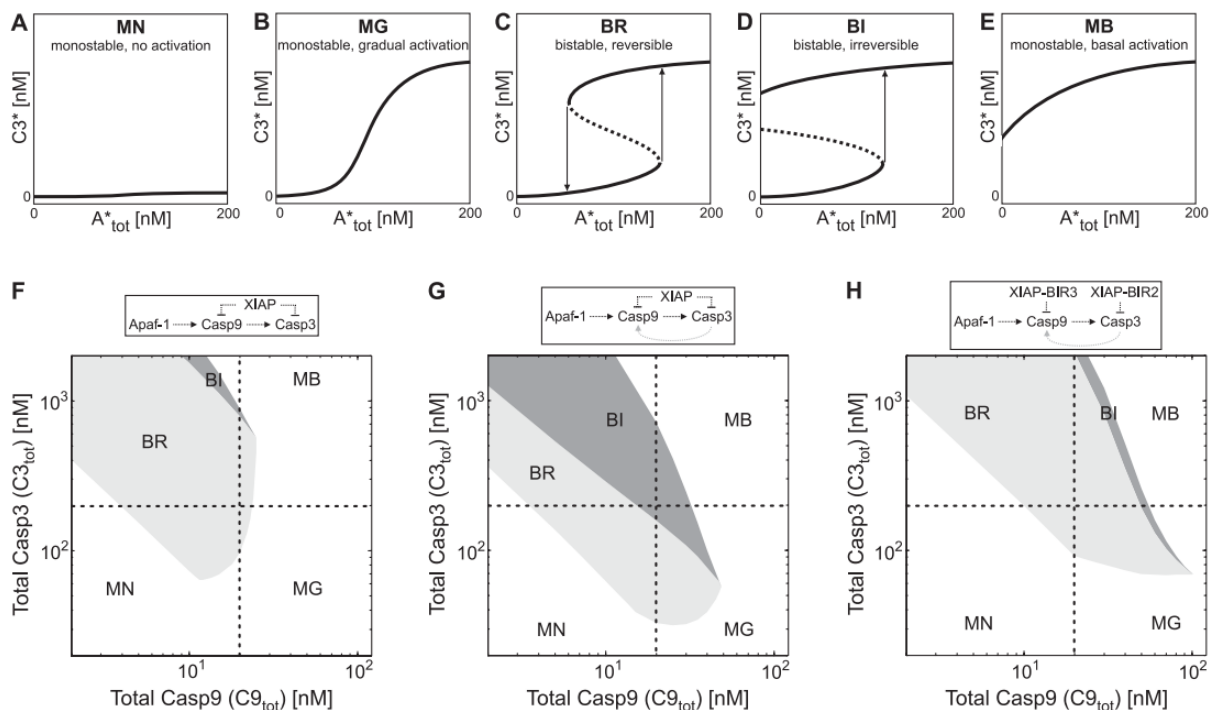


Figura 13: A-E, ejemplo de los diferentes comportamientos que puede tener el sistema en función de los parámetros utilizados. F-H, muestra los diagramas de bifurcación para el sistema, donde se observa para qué valores de $C3_{tot}$ y $C9_{tot}$ se tienen los distintos comportamientos posibles, dependiendo de los feedbacks considerados. F-Sólo doble feedback negativo, G-Feedback positivo de C3 sobre C9 y doble feedback negativo, H- Sólo Feedback positivo de C3 sobre C9 [71].

Un aspecto fundamental, de la vía intrínseca de la apoptosis es la permeabilización de la mitocondria. En el trabajo de Duesmann et al [72] se utilizaron autómatas celulares para modelar el proceso de formación de poros en la membrana mitocondrial externa. Se creó un modelo para estudiar cómo se comporta la vía intrínseca en función de la distribución espacial de las proteínas en la membrana, representadas en una grilla que se actualiza en función a un conjunto de reglas. En cada una de las celdas de la cuadrícula, puede haber de 0 a 7 proteínas diferentes que pueden reaccionar entre sí y tienen cierta probabilidad de difundir a las celdas adyacentes.

Por otro lado, los modelos booleanos también se han utilizado para modelar la totalidad de los grandes procesos que tienen lugar en la apoptosis. Si bien este tipo de enfoque tiene la limitación de que reduce la información cuantitativa que puede obtenerse del modelo, permite hacer simulaciones dinámicas incluyendo una mayor cantidad de elementos del sistema.

Tenemos, por ejemplo, el modelo booleano de Calzone et al. [73]. En este se incluyen los componentes básicos de la regulación de los fenotipos celulares posibles (Figura 14A) y dependiendo de las entradas, la célula puede sobrevivir, morir por apoptosis o por necrosis. A su vez, permite simular qué ocurre con los diferentes contextos, frente a la activación o inhibición de determinados elementos reguladores. Así, de la red de interacciones conocidas, se obtiene una red booleana con los componentes mínimos necesarios para modelar los tres posibles destinos celulares (Figura 14B). Como resultado obtienen qué proporción de los estados posibles del sistema conducen a

cada uno de los destinos posibles. Además, puede verse como, dependiendo de los componentes activados o bloqueados esta proporción cambia. (Figura 14C). Por ejemplo, se observa que si se sobreexpresan componentes antiapoptóticos de la familia Bcl-2 o se bloquea la síntesis de caspasas, la célula es incapaz de morir por apoptosis. Sin embargo, si se bloquea la vía Nfkb o se elimina cIAP, la célula necesariamente muere. A su vez, logran una reducción máxima del modelo, llegando a una red de tres componentes que se auto activan e inhiben a los otros dos (Figura 14D). Este resultado es muy interesante, ya que muestra que cada uno de los diferentes fenotipos excluye a los otros y en cada caso hay un elemento crucial para lograr alcanzarlo.

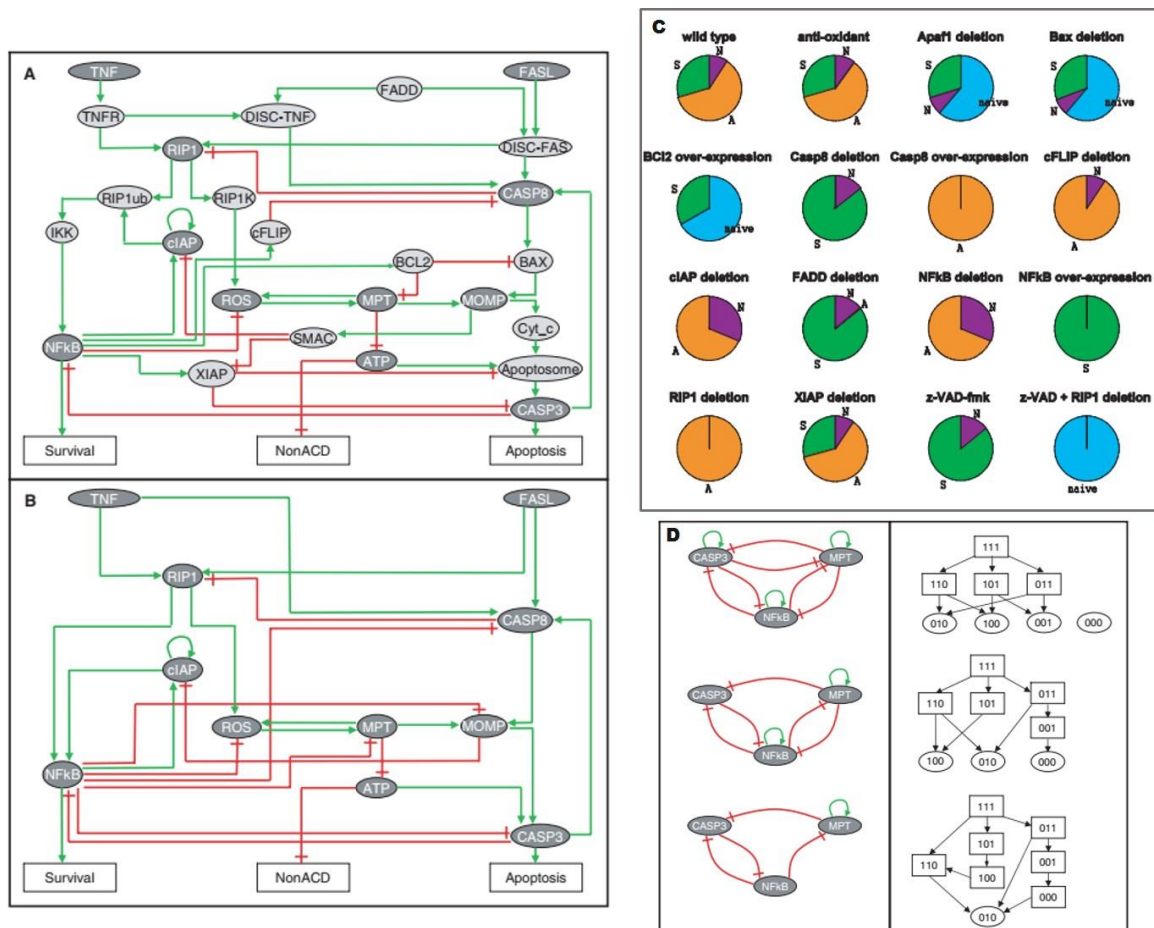


Figura 14: Resumen de los resultados obtenidos en el trabajo de Calzone et al. [73]. **A)** Esquema de las interacciones involucradas en la determinación del **fenotipo celular**. **B)** Elementos e interacciones que efectivamente se consideraron en el modelo. **C)** Resumen de la proporción de estados del sistema que llevan a la célula a cada fenotipo en diferentes condiciones: Verde - Sobrevivida (S); Naranja - Apoptosis (A); Violeta - Necrosis (N); Celeste - naive³. **D)** Modelo reducido con los componentes mínimos para simular la toma de decisión celular.

Otro ejemplo es el modelo booleano de Schlatter et al. [74], donde se genera una red que incluye componentes tanto de la vía intrínseca como la extrínseca para estudiar las interacciones entre ellas. Se encontró que la alta conectividad entre los componentes de la red y el cross-talk entre ambas vías es crucial para el correcto funcionamiento de la apoptosis.

³ Células que tienen un fenotipo no diferenciado o multipotencial

A su vez, se han desarrollado modelos para intentar entender la relación de la apoptosis con el metabolismo energético. Un ejemplo es el trabajo de Huber et al. [75] que intenta integrar el metabolismo energético de la célula (incluyendo la glicólisis y la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial) con la apoptosis. Utilizan un modelo de ecuaciones diferenciales definido en función de flujos bioenergéticos y simula cómo varían los principales indicadores de apoptosis, así como la diferencia de potencial mitocondrial. Este trabajo tiene la particularidad de que contrastan los resultados de las simulaciones con medidas experimentales a nivel de cultivo celular. Observando la Figura 15 vemos algunos de los resultados obtenidos en el trabajo. Puede verse que, durante la simulación, la salida del citocromo C mitocondrial (caída de la curva verde, Figura 15A) es seguida de la activación de la caspasa 3 (curva negra. Figura 15A). Mientras en la Figura 15B, vemos que la caída del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$) es menos pronunciada cuando se le impide a la caspasa 3 clivar los complejos I/II de la cadena respiratoria (curva azul). Finalmente, en las Figuras 15C y 15D se observan medidas experimentales para testear los resultados predichos por la simulación mostrada en la Figura 15B. Las curvas verdes corresponden a la cantidad de citocromo C intramitocondrial y las rojas a la diferencia de potencial de la mitocondria. Se puede observar una disminución pronunciada del citocromo C mitocondrial y una caída del potencial mitocondrial a medida que avanza la apoptosis (Figura 15C). Sin embargo, al impedir la retroalimentación positiva utilizando un inhibidor de la caspasa 3 (zVAD), este efecto se ve reducido (Figura 15D). Por otro lado, también encontraron que el aumento en el flujo glicolítico, permite que la producción de ATP extra se utilice para la reversión de la actividad de la ATP sintasa mitocondrial, para restaurar la diferencia de potencial mitocondrial.

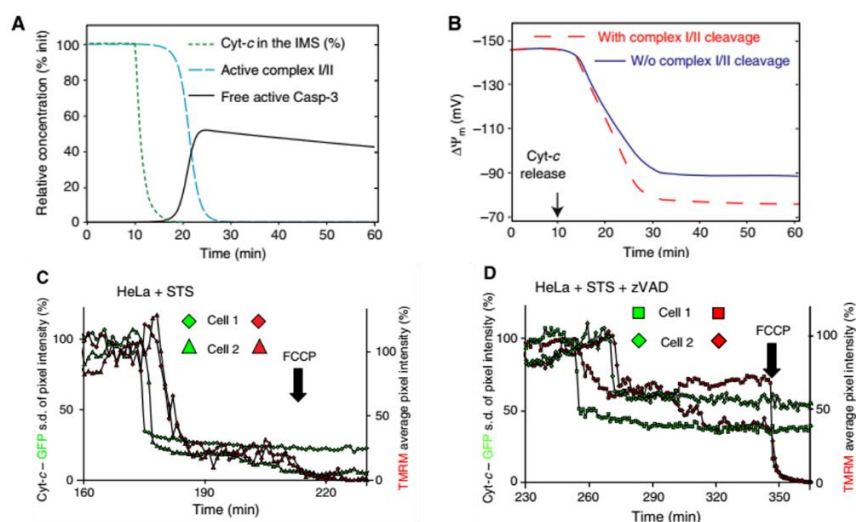


Figura 15: Ejemplo de los resultados obtenidos en el trabajo de Huber et al [75]. **(A)** Resultado de la simulación temporal para los principales componentes del sistema. Puede verse como la caída en la concentración relativa de citocromo C intramitocondrial (curva verde) precede a la activación de la caspasa 3 (curva negra). **(B)** Simulación de la variación del potencial mitocondrial durante la apoptosis. La curva roja muestra la caída en condiciones estándar y la azul corresponde a cuando se le impide a la caspasa 3 clivar los complejos de la cadena respiratoria. **(C)** Medidas experimentales de la concentración de citocromo C (curvas verdes) y diferencia de potencial mitocondrial (curvas rojas). Puede verse una caída en la diferencia de potencial mitocondrial posterior a la liberación del citocromo C. **(D)** Experimento análogo al mostrado en (C) pero utilizando un inhibidor de caspasa 3 (zVAD) para impedir el clivaje de los complejos de la cadena respiratoria.

Finalmente, podemos mencionar el modelo de López-Marín et al. [76], que intenta utilizar un modelo de ecuaciones diferenciales para simular la apoptosis en células sometidas a terapia fotodinámica⁴. Entre otras cosas, simulan qué ocurre con las células expuestas a diferentes niveles de estímulo apoptótico. Encontraron que las moléculas tBid y BAX son las moléculas que tienen el mayor efecto en la activación de la apoptosis, mientras Bcl-2 y XIAP son las principales moléculas inhibidoras. A su vez, estudiaron la relevancia relativa de las vías intrínseca y extrínseca de activación de la apoptosis en este proceso, concluyendo que la activación se da principalmente por vía intrínseca. Además, lograron simular la variabilidad célula a célula incorporando algoritmos estocásticos, obteniendo resultados que indican que la variabilidad celular en la respuesta al mismo estímulo apoptótico se debe principalmente a diferencias naturales en las concentraciones de las diferentes moléculas involucradas. Puede verse el tipo de resultados obtenidos en las simulaciones en la Figura 16. En la Figura 16A, vemos varias curvas de % de Supervivencia celular en el tiempo para diferentes niveles de tBid. Puede observarse que, al aumentar la concentración de tBid, se supera más rápidamente el umbral a partir del cual la muerte se dispara. Se puede apreciar un resultado análogo en la figura 16B, donde al aumentar la cantidad de tBid presente, el tiempo para llegar a la mitad de la concentración letal de caspasa 3 (T_{50}) disminuye. Y finalmente, en la Figura 16C, se observa la misma curva mostrada en B, pero considerando la variabilidad celular, observándose una dispersión significativa.

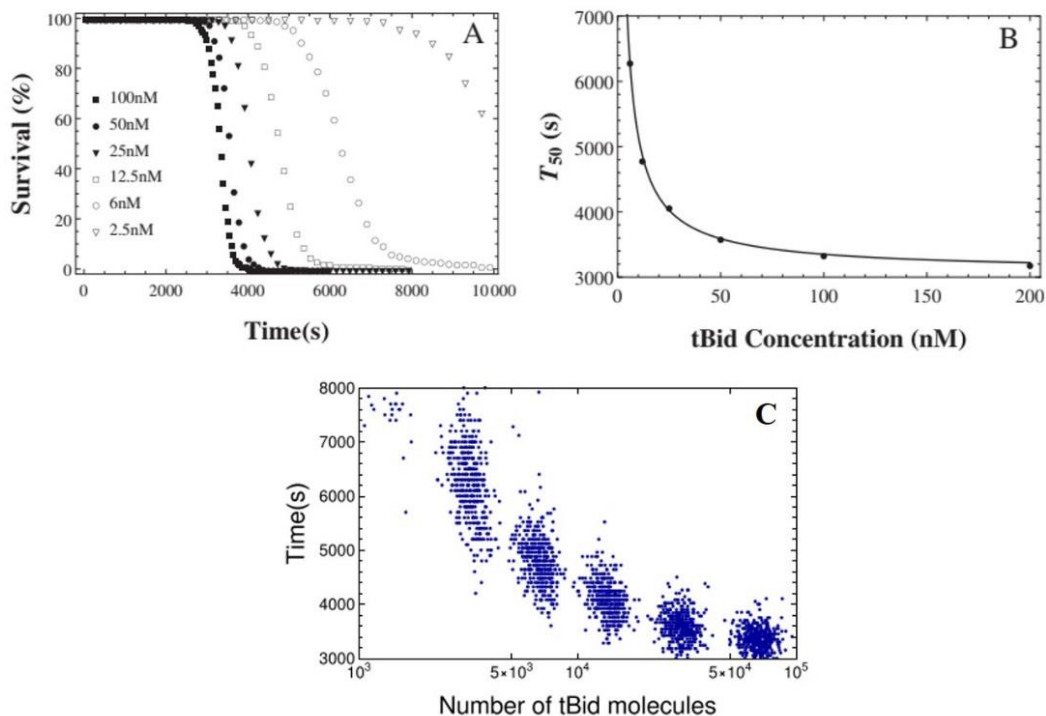


Figura 16: Algunos de los resultados obtenidos en el trabajo de López-Marín et al. [76] Se muestra que la cantidad de células que mueren por apoptosis (A) así como el tiempo necesario para que ocurra (B), depende fuertemente de la cantidad de tBid presente. Además, encuentran una gran variabilidad célula a

⁴ La terapia fotodinámica es un tipo de tratamiento utilizado para diferentes enfermedades, como el cáncer. Consiste en la aplicación de una molécula fotosensible que se localice preferentemente en una zona, por ejemplo, un tumor, y se activa con radiación a una determinada longitud de onda. El efecto inmediato es la generación masiva de especies reactivas del oxígeno que causan la muerte celular por necrosis en los primeros minutos. Pero en horas posteriores, células alcanzadas por una menor dosis del tratamiento pueden morir por apoptosis.

célula (C) en las moléculas relacionadas con la apoptosis. (A) Muestra la simulación del % de células que sobreviven al estímulo apoptótico para diferentes concentraciones de tBid utilizadas. (B) Se muestra como varía el tiempo para alcanzar la mitad de la concentración de caspasa 3 considerada como letal (T_{50}) en función de la concentración de tBid. (C) Como varía la concentración de tBid en el tiempo incluyendo la variabilidad célula a célula en los niveles de las moléculas.

En resumen, dada la complejidad de la apoptosis, sumada a la enorme variabilidad que existe entre diferentes tipos celulares e incluso entre células iguales de una misma población, se hace necesaria la utilización de modelos matemáticos. Estos se requieren tanto para intentar interpretar la gran cantidad de información experimental no estandarizada que existe, así como para servir de guía a la hora de diseñar nuevos experimentos.

1.8) Modelo de la vía intrínseca de la apoptosis de Legewie et al.

Para estudiar la vía intrínseca de la apoptosis, utilizamos el modelo de Legewie et al [71]. Este considera como componentes las caspasas 3 y 9, el complejo formado por Apaf-1 y el citocromo C (A^*) y el inhibidor de la apoptosis XIAP (X), así como las interacciones entre los mismos (Figura 17). A partir de esto, se genera un sistema de trece ecuaciones diferenciales que describe la activación de la apoptosis por vía intrínseca, utilizando como estímulo la cantidad de A^*_{tot} presente. Como indicador de la activación de la vía intrínseca se tomó la cantidad de Caspasa 3 activa ($C3^*$). En la Figura 18 se describe gráficamente el comportamiento de $C3^*$ en este modelo. Brevemente, tenemos que para el modelo de Legewie la activación de C3 presenta una cinética ultrasensible (sigmoide). Puede verse que el tiempo de la activación, así como la cantidad de $C3^*$ alcanzada depende de la intensidad del estímulo. A su vez, a partir del diagrama de bifurcación, se deduce que la activación es biestable e irreversible. (Notar que luego de que el sistema alcanza la rama alta, aunque se elimine completamente el estímulo, no se puede volver al estado inicial)

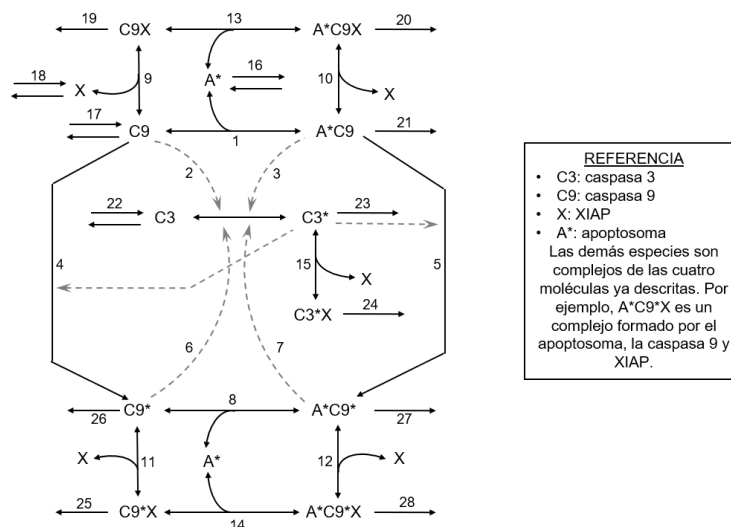


Figura 17: Esquema del modelo de Legewie et al. Resume todas las reacciones e interacciones entre los componentes del modelo. Las flechas sólidas representan las reacciones químicas, aquellas con doble punta son reversibles y las de una punta irreversibles. Las flechas punteadas representan interacciones no lineales donde en el origen se encuentra el activador y al final la reacción activada. El activador no es consumido durante la reacción. Los números solamente representan el número de reacción, se utilizan para ordenarlas y no tienen un significado. Adaptado de [71]

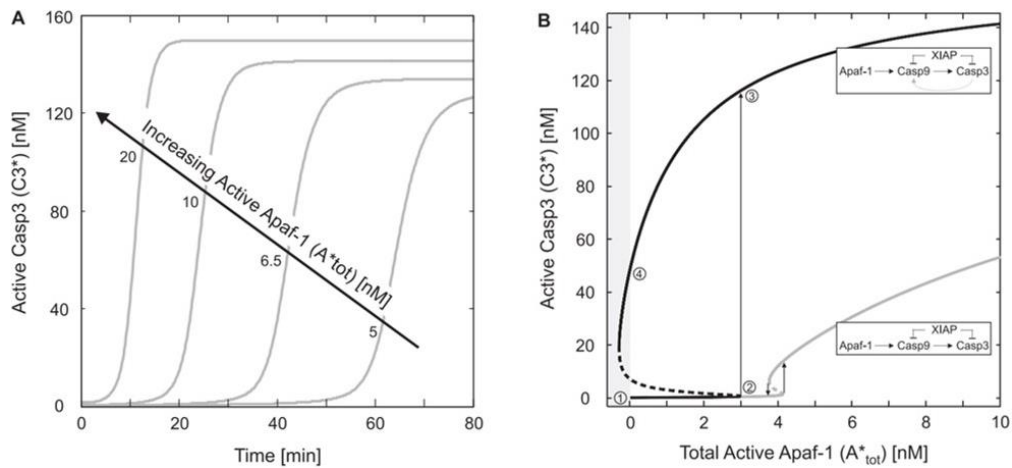


Figura 18: Resultados obtenidos en el trabajo de Legewie et al. **(A)** Simulación del curso temporal de activación de la caspasa 3 para concentraciones crecientes de A*_{tot} (Apaf-1 + citocromo C). **(B)** Diagrama de bifurcación en función de la cantidad total de A* [71]

1.9) Modelo de la glicólisis de Mulukutla et al.

Para representar mejor los aspectos energéticos de la apoptosis, decidimos incluir en algunos de los modelos estudiados en el presente trabajo la glicólisis, ya que es una de las principales vías de producción de ATP, en especial en condiciones anaeróbicas o en situaciones de alta proliferación celular.

Para estos fines, utilizamos el modelo de glicólisis de Mulukutla et al. [77]. La versión completa de este modelo considera las diez reacciones de la glicólisis que llevan de glucosa a piruvato, el pasaje de fructosa 1,6 bi fosfato a fructosa 2,6 bi fosfato y la reacción de piruvato a lactato (Figura 19).

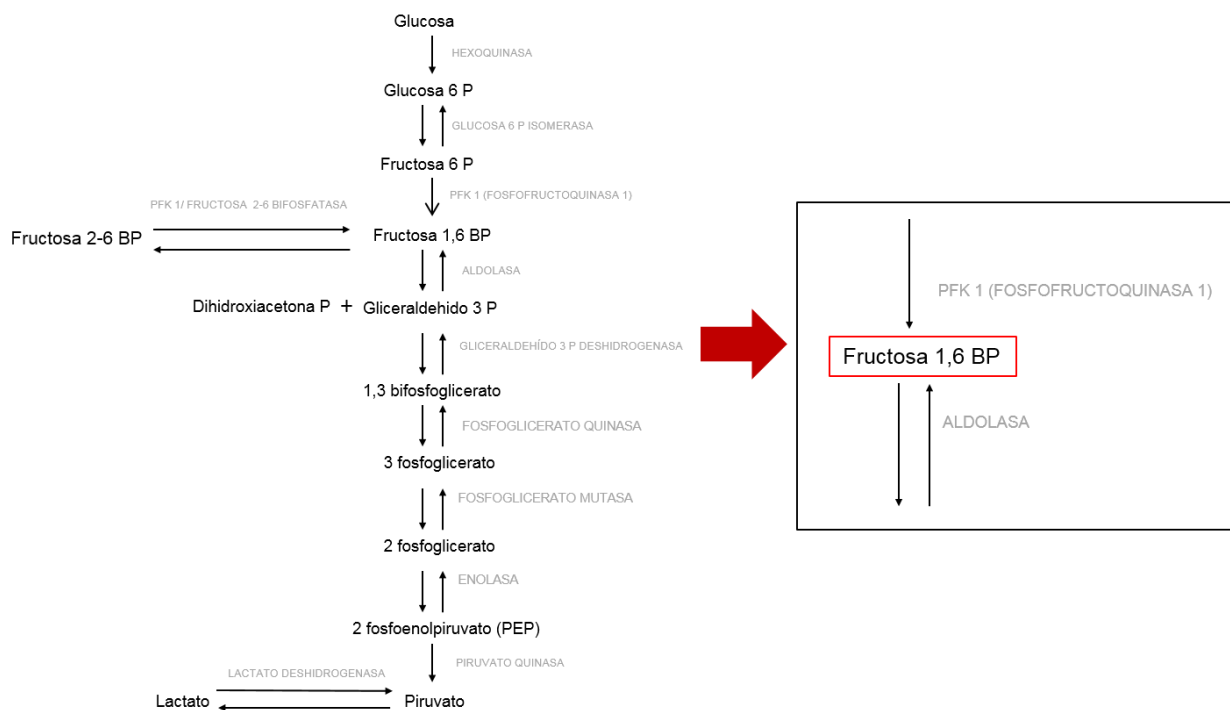


Figura 19: Esquema de reducción de la glicólisis. Se considera la fructosa 1,6 bi fosfato y las reacciones que la afectan directamente. De esta forma se representa el flujo glicolítico y a la vez se reduce la complejidad del sistema.

Dada la complejidad del modelo completo de Mulukutla et al, para las simulaciones de esta tesis, se utilizó una reducción de modelo propuesta por los autores (Figura 19). En particular, se considera como único intermediario la fructosa 1,6 bi-fosfato, incluyendo las reacciones que la producen y consumen. En otras palabras, el modelo de glicólisis reducido quedaría representado por una única ecuación diferencial que considera las reacciones catalizadas por las enzimas fosfofructoquinasa 1 (PFK1) y aldolasa (ALDO).

Este modelo presenta biestabilidad en el flujo glicolítico, en función de los valores de fructosa-6-fosfato (F6P) disponible (Figura 20). Se pueden identificar los estados estables como los modos de funcionamiento de la vía, uno de bajo flujo, que opera en condiciones normales y otro alto flujo que se activa frente a un aumento de la demanda energética. Puede pensarse que el pasaje de un flujo al otro en función de F6P se debe a que este metabolito sería una medida de cuánta glucosa está entrando a la célula y, por tanto, de qué tanta energía se necesita.

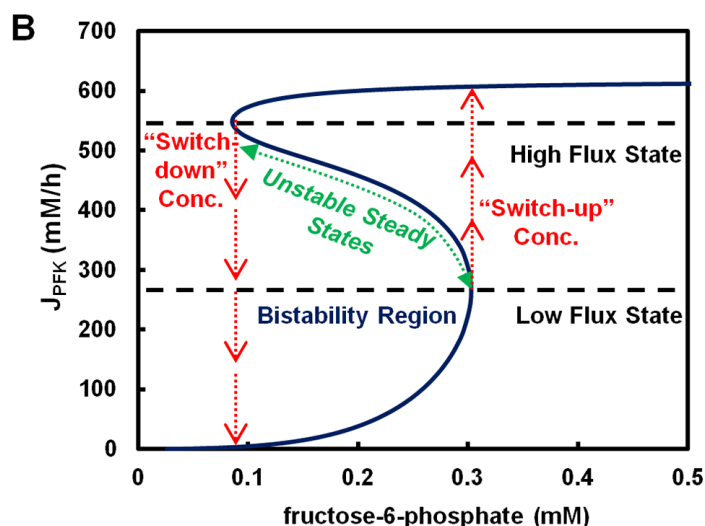


Figura 20: Resultados obtenidos por Mulukutla et al. para el estudio de los flujos estacionarios de glucosa. Puede verse que el flujo glicolítico estacionario es biestable y reversible. El sistema puede alternar entre los estados de alto y bajo flujo según sus requerimientos energéticos [77].

2) Métodos y procedimientos

En este trabajo, se utilizaron sistemas de ecuaciones diferenciales para describir el comportamiento de los distintos componentes del sistema. 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 puede representar mediante una ecuación diferencial matricial:

$$\frac{d\vec{x}}{dt} = N \cdot \vec{v} = f(\vec{x})$$

donde \vec{x} es el vector de las concentraciones de las especies, N es la matriz de coeficientes estequiométricos y \vec{v} es el vector de las velocidades. En el estado estacionario $(d\vec{x}/dt) = 0$ y entonces:

$$N \cdot \vec{v} = \vec{0}$$

donde $\vec{0}$ 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 $(J = \frac{\partial f(\vec{x})}{\partial x} \Big|_{ee})$ 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 cálculo de los estados estacionarios se realizó variando el valor de alguno de los parámetros del sistema (parámetro de bifurcación). Se observa cómo varían las concentraciones estacionarias y cuántos estados estacionarios presenta el sistema para cada valor de dicho parámetro. La elección del parámetro a estudiar dependerá de los aspectos del funcionamiento del sistema que se quieran analizar. Seguidamente se estudió la estabilidad de los estados encontrados para determinar cuáles son estables y cuáles inestables.

En general los sistemas dinámicos pueden presentar diferentes comportamientos dependiendo de los parámetros del sistema. En particular pueden clasificarse en función de la cantidad de estados estacionarios que presentan y la estabilidad de estos. Por ejemplo, si un sistema presenta dos estados estacionarios estables para cierto rango de parámetros, se dice que el mismo es biestable o que presenta biestabilidad (Figura 13 C). Una característica interesante de los sistemas biestables es que presentan histéresis. Esta puede entenderse como la capacidad de guardar información de una perturbación ya desaparecida. A nivel práctico, puede decirse que un sistema presenta histéresis cuando el camino para ir de un estado "a" a un estado "b" es diferente al camino para ir de "b" a "a".

Este efecto se ve claramente en los sistemas biestables. En particular, algunos sistemas tienen comportamiento irreversible, es decir, una vez que se alcanza cierto estado, no se puede salir del mismo (Figura 13D).

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.

Construcción de diagramas de bifurcación:

Para construir los diagramas de bifurcación se calculan los estados estacionarios del sistema para diferentes valores de un parámetro elegido. A nivel práctico, se resuelve el sistema de ecuaciones diferenciales igualado a 0 (condición de estado estacionario) utilizando un solver numérico de ecuaciones. Para cada uno de los estados obtenidos, se estudia su estabilidad, calculando los valores propios del jacobiano evaluado en dicho estado (puede resolverse la ecuación característica del sistema explícitamente o utilizar la función “Eigenvalues” sobre el jacobiano). Dependiendo del signo de la parte real del valor propio de mayor valor, se decide si el estado es estable o inestable. A efectos de visualizar más fácilmente la estabilidad los estados estables se imprimen en negro y los inestables en rojo.

3) Resultados y discusión

3.1) Modelos utilizados

En el transcurso de este trabajo los diferentes estudios se harán en base al “Modelo de Legewie et al.” de la apoptosis [71] (Sección 1.8), un “Modulo de activación” de la apoptosis, construido en el marco de la presente tesis, y el modelo de “Glicólisis reducida” del trabajo de Mulukutla et al. [77] (Sección 1.9) o combinaciones de estos, para estudiar diferentes aspectos de la vía intrínseca de la apoptosis.

3.1.1) Verificación de resultados del modelo de Legewie et al.

Primeramente, se reprodujeron satisfactoriamente los resultados obtenidos en el trabajo de Legewie et al., tanto las simulaciones temporales como los diagramas de bifurcación (Figura 21).

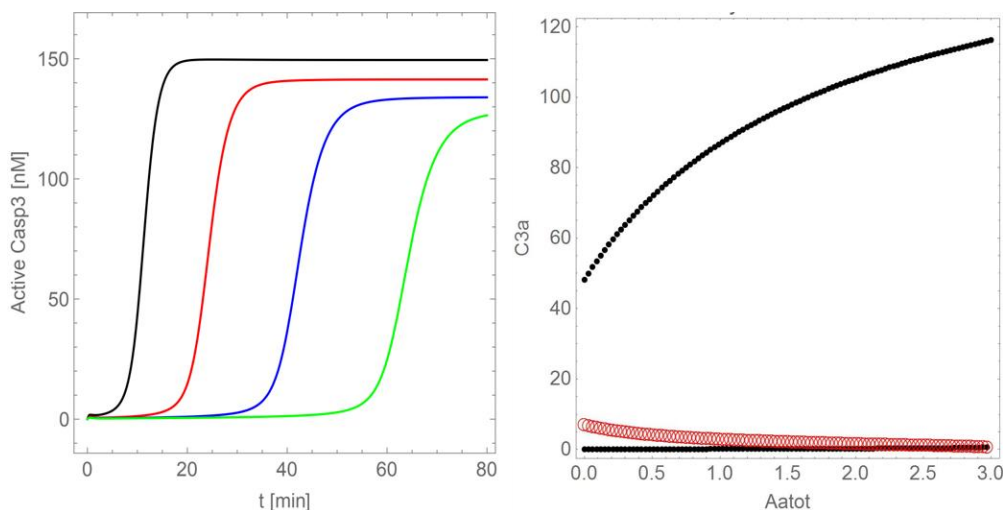


Figura 21: Resumen del comportamiento del modelo de Legewie et al. A la izquierda se observa el curso temporal de la activación de $C3^*$ para diferentes valores de A^{*tot} . A la derecha, tenemos el diagrama de bifurcación de $C3^*$ vs A^{*tot} donde puede verse claramente que la activación de la caspasa 3 es biestable e irreversible (ver las ecuaciones y los valores de parámetros utilizados en los anexos).

3.1.2) Módulo de activación

Para lograr entender mejor el funcionamiento de la vía intrínseca de la apoptosis, creamos un “Módulo de activación” de la apoptosis.

En el modelo se incluye, a grandes rasgos, la regulación de la apoptosis a nivel mitocondrial (Figura 22). Este módulo responde a diferentes estímulos, (por ejemplo, el daño en el DNA) que se reflejan en la aparición de la proteína BAK, la cual forma poros en la membrana mitocondrial externa y promueve la liberación de proteínas proapoptóticas. En este caso, incluimos al citocromo C (CytC), que forma parte del apoptosoma y SMAC, una proteína que secuestra al inhibidor de la apoptosis XIAP. Finalmente, la salida de este módulo es la formación del complejo Apaf-1+CytC (A*), que es el responsable de desencadenar la cascada de caspasas.

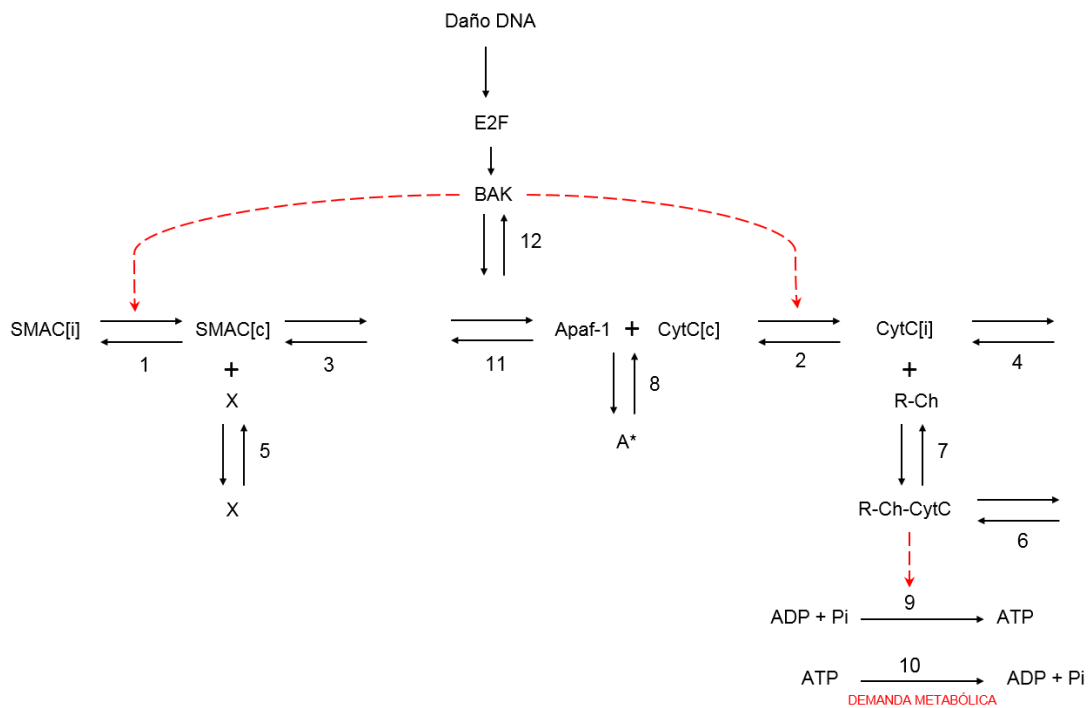


Figura 22: Esquema del Módulo de activación, diseñado para incorporar la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis por la mitocondria y la influencia sobre el metabolismo energético. CytC: citocromo C; RCh: cadena respiratoria; A*: Apaf-1+CytC[c]; [i]: especie intramitocondrial, [c] especie citosólica. Las flechas sólidas representan las reacciones químicas, doble flecha indica reacciones reversibles y flecha simple irreversibles. Las flechas punteadas rojas representan interacciones no lineales donde en el origen se encuentra el activador y al final la reacción activada. El activador no es consumido durante la reacción. Los números solamente representan el número de reacción, se utilizan para ordenarlas y no tienen un significado.

Adicionalmente, para observar la interacción de la apoptosis con el metabolismo energético, incorporamos el efecto de la activación de la misma sobre la cadena respiratoria (RCh). Con este fin, se consideró que las proteínas proapoptóticas CytC y SMAC pueden estar tanto en la mitocondria como en el citosol. En particular, para que la cadena respiratoria funcione correctamente, el citocromo C debe estar dentro de la mitocondria. Esta interacción es representada por el complejo RCh-CytCi. Además, se incorporó una reacción de demanda metabólica, que engloba todas las reacciones que consumen energía dentro de la célula.

3.1.3) Modelo de Apoptosis Extendida

Al combinar el módulo de activación con el modelo de Legewie, obtenemos un modelo de Apoptosis extendida, que contiene la cascada de caspasas, así como los aspectos básicos de los mecanismos desencadenantes de la vía intrínseca de la apoptosis. En este caso la velocidad v_{16} del modelo de Legewie (que representaba la formación de A^*), es reemplazada por las velocidades v_{8L} (formación de A^* a partir de Apaf-1 y CytC) y v_{11L} (síntesis y degradación de Apaf-1).

3.1.4) Verificación de resultados del modelo de glicólisis de Mulukutla et al.

Si bien logramos reproducir cualitativamente los resultados reportados para este modelo, no se logró llegar a las mismas concentraciones de F16BPc descritas en el diagrama original del artículo (comparar Figura 20 y 23). El motivo de la discrepancia es incierto ya que, en principio, utilizamos las mismas leyes de velocidad y los mismos valores para los parámetros que los reportados por los autores. Podría deberse a que en el trabajo se utilizó algún valor para los parámetros diferente a los reportados en el artículo o que se tomó alguna simplificación extra del modelo que no fue explicitada.

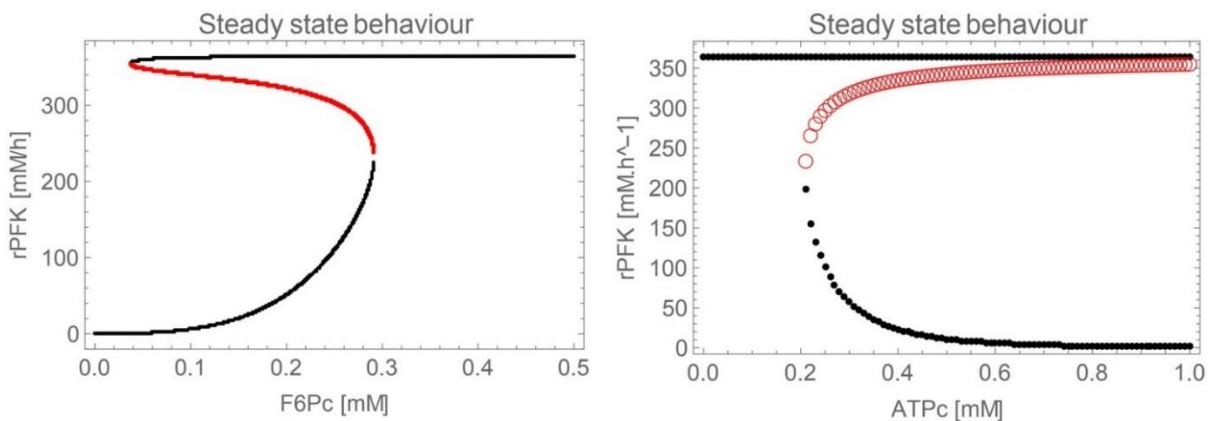


Figura 23: Diagramas de bifurcación para el modelo de glicólisis de Mulukutla et al. reducido. A la izquierda se utiliza la concentración de fructosa 6P citosólica (F6Pc) como parámetro de bifurcación, mientras a la derecha, se utiliza la concentración de ATP citosólico (ATPc) (ver las ecuaciones y los valores de parámetros utilizados en los anexos). Estos diagramas fueron realizados en el presente trabajo.

Además del diagrama de bifurcación presentado por Mulukutla et al. en su trabajo, decidimos hacer el mismo análisis, pero para una concentración de F6Pc compatible con la biestabilidad y utilizando ATPc como parámetro de bifurcación. Podemos observar que existe biestabilidad para cierto rango de concentraciones de ATPc y nuevamente podemos asociar los dos estados estables con los modos de alto y bajo flujo de la glicólisis (Figura 23). Sin embargo, al aumentar la cantidad de ATPc disponible, el flujo glicolítico disminuye. Esto es coherente con el conocimiento de la regulación de la glicólisis, ya que se sabe que cuando la cantidad de ATP disponible es baja, la vía se activa, y se inhibe al aumentar la concentración de ATP.

Observando los diagramas de bifurcación (Figura 23), podemos ver que la transición entre un modo de flujo y el otro es reversible (esto puede verse fácilmente porque las curvas no cortan el eje de las ordenadas). Es decir que al disminuir o aumentar el

parámetro de bifurcación se puede cambiar de un modo a otro. Es importante destacar que, si bien el proceso es reversible, el camino para ir del estado de bajo flujo al de alto flujo es diferente al camino para ir de alto a bajo flujo. En otras palabras, la glicólisis presenta histéresis.

Este comportamiento parece razonable porque una célula debe ser capaz de cambiar de un estado a otro en caso de necesitarlo y de manera relativamente rápida. Pero, al mismo tiempo, no debe ocurrir que se “salte” de un estado al otro por pequeñas fluctuaciones en las concentraciones de metabolitos. En otras palabras, la biestabilidad parece ser un mecanismo adecuado para permitir la toma de decisión a la célula respecto a su estado energético.

3.1.5) Modelo integrado Apoptosis Metabolismo

Finalmente, el modelo integrado de apoptosis con el metabolismo es un modelo que incluye la vía intrínseca de la apoptosis, así como los aspectos básicos del metabolismo energético (cadena respiratoria y glicólisis). Se compone por el modelo de Apoptosis Extendida (sección 3.1.3) al que se le acopla la glicólisis reducida de Mulukutla et al. (sección 1.9). En este caso, se modifican la ecuación del ATP, a la cual se le agrega la contribución de la glicólisis y las velocidades que involucran la interacción de A^* con C9 (v_1 , v_8 , v_{13} , v_{14}), ya que estas pasan a consumir ATP.

3.2) Análisis de estados estacionarios y estabilidad

3.2.1) Módulo de Activación

Al analizar los estados estacionarios del módulo de activación, aisladamente vemos que es monoestable para todo el rango de BAK considerado (0-10 nM) (Figura 24). A su vez, podemos apreciar efectivamente que la cantidad de proteínas proapoptóticas presentes en el citosol es proporcional a la intensidad del estímulo. Se observa que la cantidad de complejo RChCytC, que representa la cadena respiratoria activa, no cambia con A^*_{tot} y tampoco lo hace la cantidad de ATP disponible. Esto implica que en este módulo si bien hay un transporte neto del citocromo C hacia el citosol, no se ve una disrupción de la cadena respiratoria. Es decir, la activación de este módulo por sí mismo no afecta el equilibrio energético de la célula.

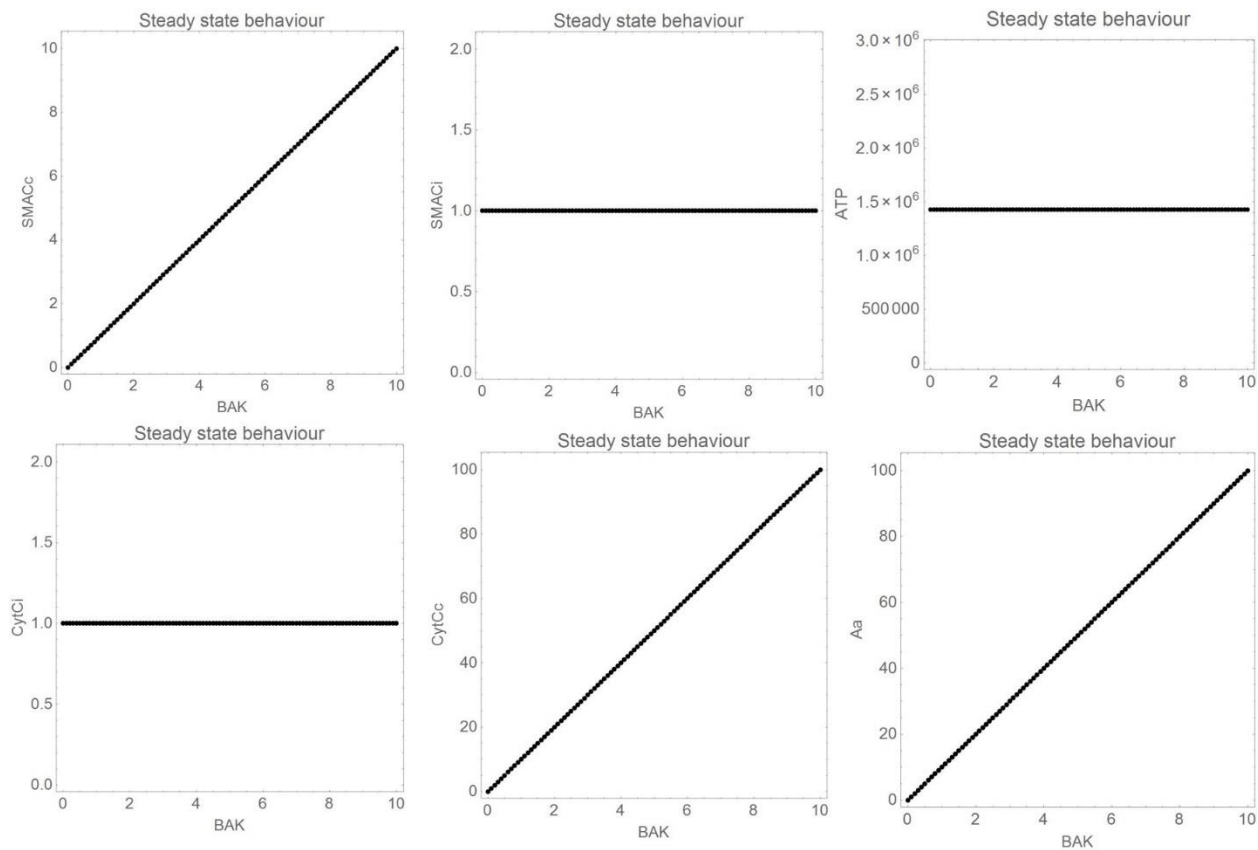


Figura 24: Diagramas de bifurcación en función de BAK para los once componentes del sistema. Concentraciones en nM (ver las ecuaciones y los valores de parámetros utilizados en los anexos).

3.2.2) Apoptosis Extendida (en función de BAK y A^{*tot})

Como habíamos mencionado, al combinar el módulo de activación con el modelo de Legewie et al. obtenemos el modelo de “Apoptosis Extendida”

Se realizó el cálculo de los estados estacionarios variando la intensidad del estímulo apoptótico (en este caso la concentración de BAK). Puede apreciarse, que el sistema presenta biestabilidad en todo el rango de concentraciones considerado (Figura 25c). Se observa claramente que el sistema presenta dos estados estables, uno compatible con el estado de sobrevida (rama baja) y otro de activación de la apoptosis (rama alta). A su vez, la rama inestable (rojo), está colapsada sobre la rama estable inferior. Esto podría indicar que la célula tiene cierta predisposición a morir por apoptosis, ya que la cuenca de atracción del estado de sobrevida es mucho menor que la del estado de muerte. Parece un resultado coherente, ya que, en el módulo de activación incorporado, solo se agregan componentes relacionados con la activación, siendo XIAP el único inhibidor considerado. En otras palabras, vale la pena recordar que el modelo tiene cierto sesgo hacia componentes activadores de la apoptosis, mientras en la célula existe un delicado balance entre proteínas anti y proapoptóticas, que determina el destino de la célula [27].

Adicionalmente, se realizó el diagrama de bifurcación para el modelo extendido en función de A^{*tot} (Figura 25b) con el fin de comparar los resultados más fácilmente con los obtenidos con el modelo de Legewie et al (Figura 25a). En rasgos generales, con el

modelo de apoptosis extendida se obtienen resultados muy similares a cuando se utiliza únicamente el modelo de Legewie et al. El sistema es biestable (con un estado de baja y uno de alta concentración de caspasa 3 activa) e irreversible en el rango de parámetros considerado. Sin embargo, el valor de caspasa 3 máxima alcanzada por el Modelo de Apoptosis extendida es menor y el punto de bifurcación donde el sistema para de ser biestable a monoestable está después de los 3 nM. (Figura 25a, b).

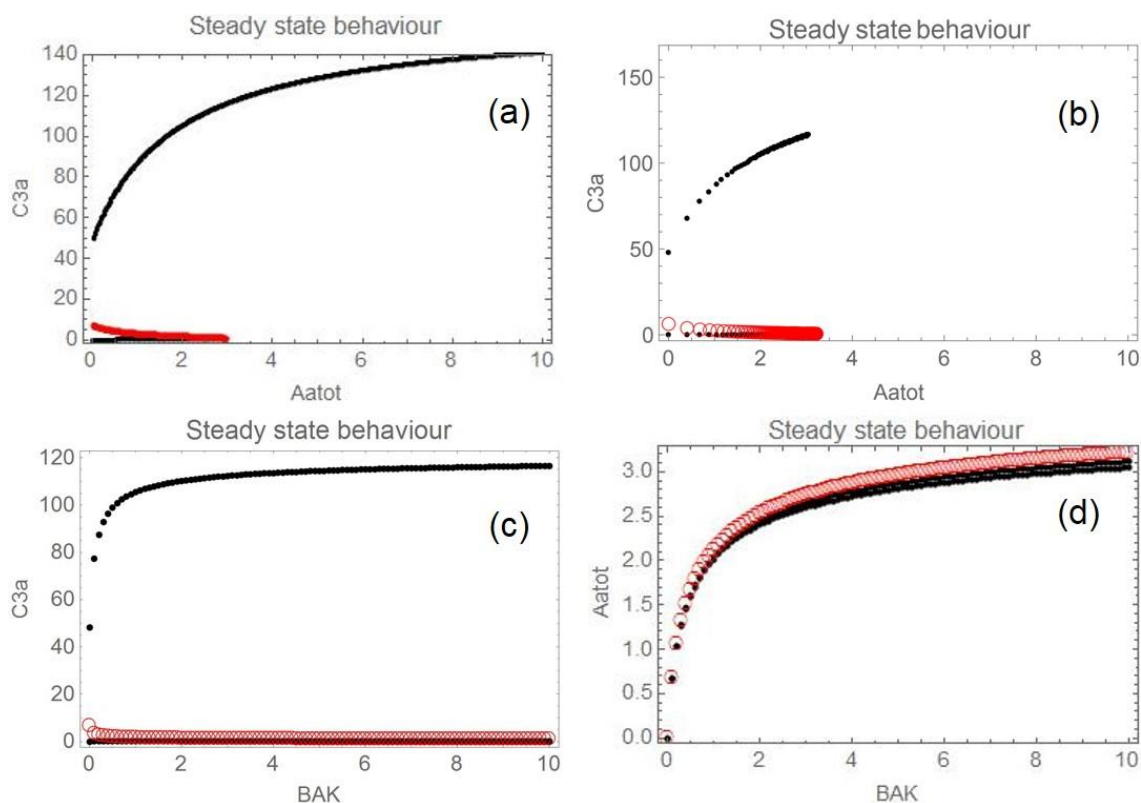


Figura 25: Resultados del análisis de estados estacionarios para el modelo extendido de la apoptosis. (a) Diagrama de bifurcación $C3^*$ vs A^{*tot} para el modelo de Legewie et al. (b) Diagrama de bifurcación $C3^*$ vs A^{*tot} para el modelo de apoptosis extendida. (c) Diagrama de bifurcación para el modelo de apoptosis extendida $C3^*$ vs BAK. (d) Relación entre la concentración de BAK utilizada como estímulo y la concentración de A^{*tot} alcanzada. Dado que en el modelo de apoptosis extendida A^{*tot} es una variable cuyo valor va entre 0 y 3 nM aproximadamente (gráfico (d)), el gráfico (b) solo puede graficarse en este intervalo de valores de A^{*tot} (ver las ecuaciones y los valores de parámetros utilizados en los anexos).

Finalmente, analizamos la relación entre el estímulo por BAK y la concentración de A^{*tot} alcanzada (Figura 25d). A diferencia de lo que se observa cuando se estudia el Módulo de Activación por separado (Figura 24), la cantidad de A^{*tot} no es proporcional a la cantidad de BAK, sino que, presentan una relación de saturación. En otras palabras, hay un límite para la respuesta que puede provocar BAK en cuanto a la activación de la apoptosis. Esto es bastante razonable, porque se tiene que para los valores de BAK, considerados, el sistema es biestable, y A^{*tot} siempre se mantiene en el rango donde para el modelo de Legewie et al. el sistema es biestable. Una explicación para este límite en cuanto a la producción de A^* , podría ser que a diferencia de en el módulo de activación aislado, en el modelo de apoptosis extendida hay muchos complejos que requieren a A^* para su formación, haciendo que haya una sola forma de agregar a A^* al pool total, pero muchas formas de degradarlo.

En resumen, al incorporar el módulo de activación monoestable al módulo biestable de la cascada de caspasas, el sistema continúa siendo biestable y cualitativamente el comportamiento de los estados estacionarios se mantiene. Además, la incorporación de BAK, modifica la estructura de tal manera que el sistema es biestable para un amplio rango de concentraciones de BAK. Se estudiará más adelante (sección 3.5.1), si la aparente predisposición del sistema a activar la apoptosis se verifica en los cursos temporales del sistema.

3.2.3) Simplificación del modelo de Glicólisis reducido

Dado que se desea incorporar la glicólisis al modelo de apoptosis extendida, cabe preguntarse si acaso existe alguna simplificación del modelo de glicólisis reducido, que siga manteniendo el comportamiento cualitativo del modelo original, pero que sea matemáticamente más simple.

Entre otras cosas, nos interesa conservar la biestabilidad de la glicólisis para observar qué ocurre con la estabilidad de los estados al combinarla con otros módulos biestables o monoestables.

Para ello, decidimos reducir el exponente “ n ” en la ley de velocidad $rPFK$. Este parámetro, da cuenta de la cooperatividad y las interacciones alostéricas de la enzima fosfofructoquinasa 1. El motivo para elegir este parámetro es que la fuerte no linealidad de dicha ecuación, causada principalmente por el exponente, dificulta mucho la resolución del sistema, en particular cuando se combina con otros módulos, como se verá más adelante.

Al repetir los cálculos en estado estacionario para diferentes valores de n , se obtuvo que para $n = 3$, se mantiene la biestabilidad de la glicólisis, como puede apreciarse en la Figura 26. Cualitativamente, se mantiene el comportamiento observado cuando $n = 4$, pero en un rango más acotado. Además, se alcanzan valores similares de flujo por $rPFK$. Sin embargo, al analizar el sistema para $n = 2$, si bien se mantiene la biestabilidad en un rango muy pequeño de valores de F6Pc, esta desaparece cuando se estudia la estabilidad en función de ATPc (Figura 27). Finalmente, al llevar $n = 1$, la biestabilidad desaparece por completo (Figura 28).

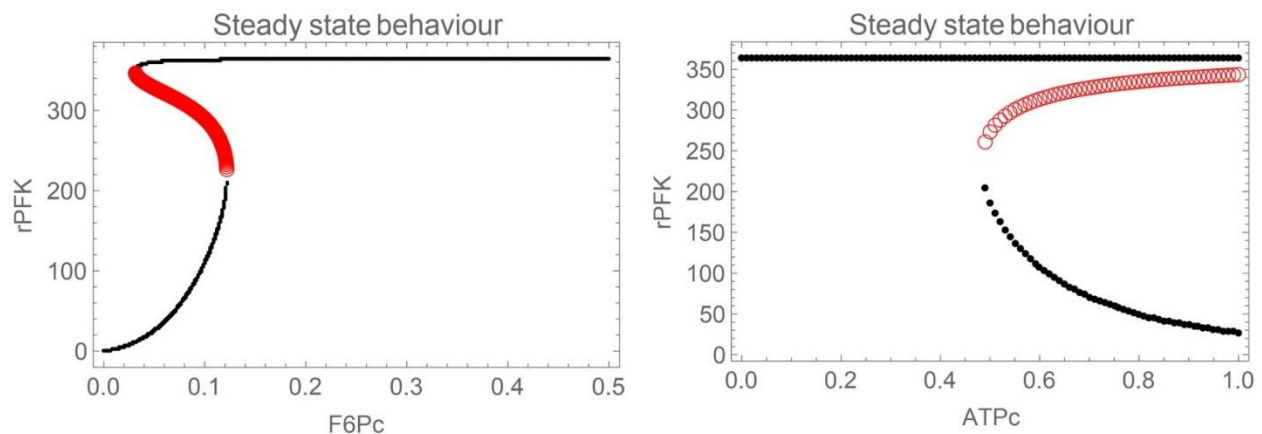


Figura 26: $n=3$

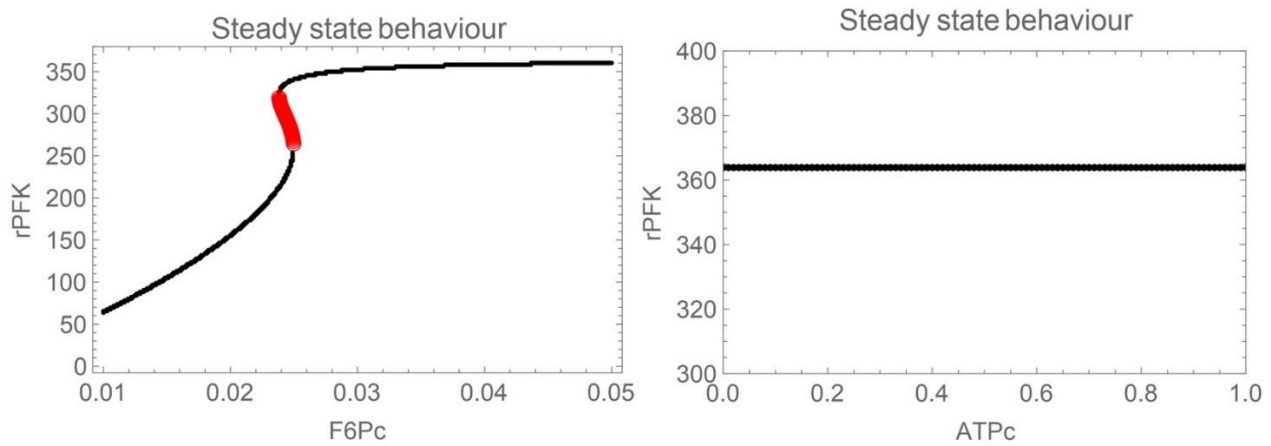


Figura 27: $n=2$

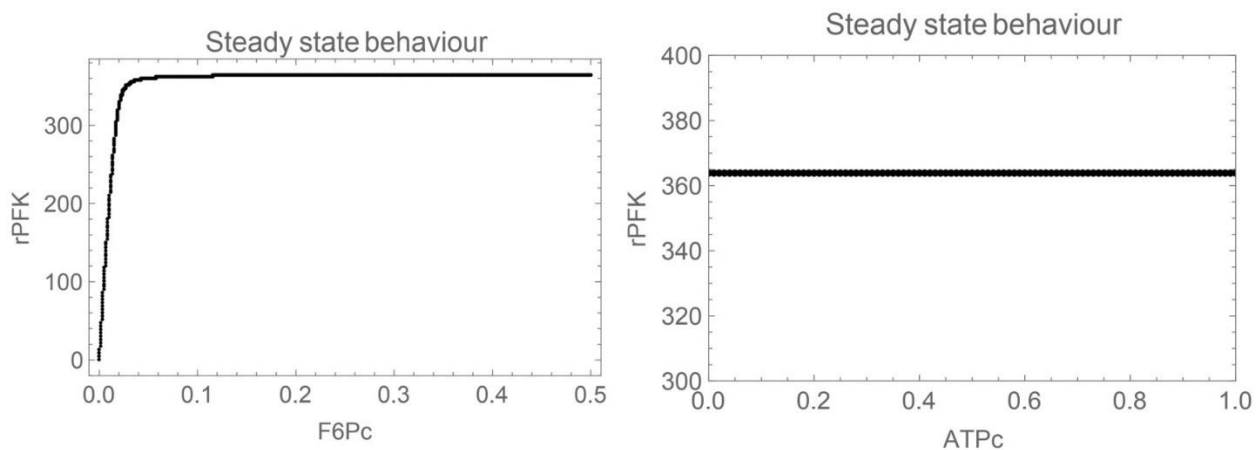


Figura 28: $n=1$

Como conclusión, podemos decir que se puede reducir el valor de n de 4 a 3, manteniendo las características generales del modelo original, lo que permite reducir apreciablemente el tiempo de cálculo para el modelo integrado (ver siguiente sección). Aproximadamente, se pasa de 120 minutos por punto a 55 minutos.

3.2.4) Modelo integrado

Como se dijo anteriormente, el modelo integrado incluye el modelo de Legewie et al, el módulo de activación y el modelo de glicólisis reducido de Mulukutla et al. A pesar de que al incorporar la glicólisis a la apoptosis extendida solo se añade una ecuación diferencial, la complejidad al resolver el sistema aumenta enormemente. Esto se debe principalmente, a la fuerte no linealidad de las leyes de velocidad de la glicólisis, en particular, la de la fosfofructoquinasa 1 ($rPFK$). Computacionalmente hablando, se pasa de un tiempo de cálculo de unos cuantos minutos para obtener el diagrama, a alrededor de tres horas para obtener cada punto. Esto hace que para obtener un diagrama de bifurcación con una cantidad razonable de puntos se requieren al menos cuatro días de cálculo.

Interpretación de la multiestabilidad

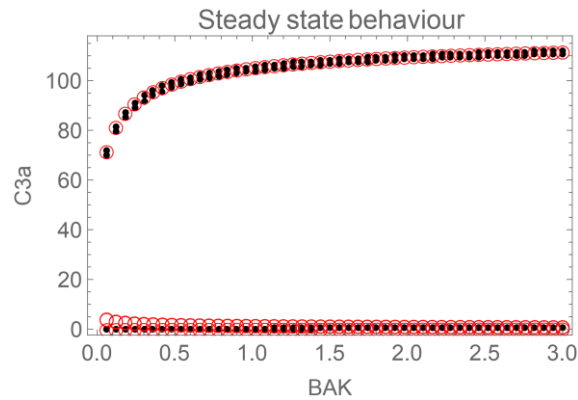


Figura 29: Diagrama de bifurcación para el Modelo integrado (que considera le módulo de activación, el modelo de Legewie et al y la glicólisis reducida de Mulukutla et al). Ver las ecuaciones y los valores de parámetros utilizados en los anexos.

Al realizar el diagrama de bifurcación correspondiente, en el rango de BAK entre 0 y 3, se obtienen un total de 9 estados estacionarios para cada valor del parámetro. Sin embargo, las distintas variables del sistema sólo adoptan un máximo de tres valores de concentración diferentes para un valor dado de BAK (Figura 29). Observando la Figura 30, vemos que efectivamente las variables del sistema pueden tomar solo tres valores estacionarios, a pesar de que el sistema presenta nueve estados.

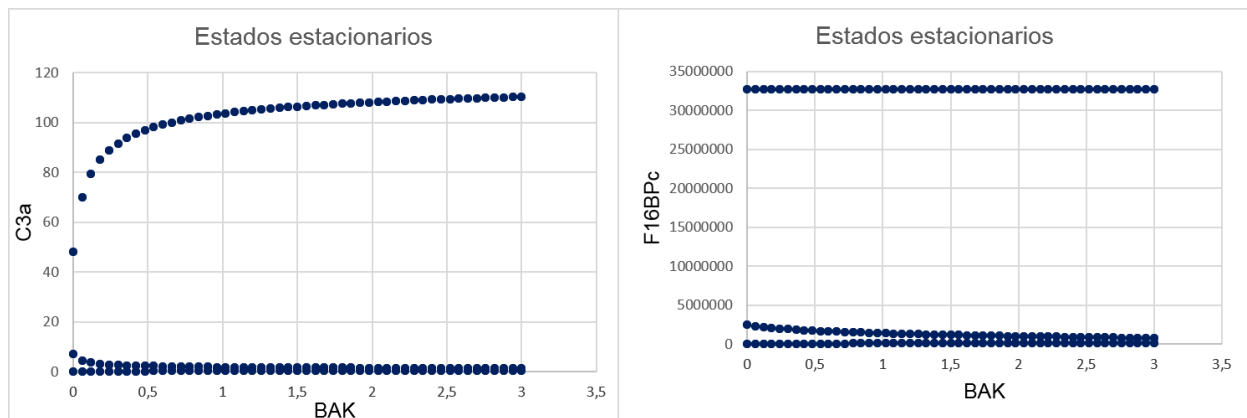


Figura 30: Gráfico de las concentraciones de las variables. Se muestran los resultados para C3* como representante del módulo de apoptosis y para F16BPc como componente de la glicólisis.

Como se mostró en las secciones anteriores, tanto el modelo de apoptosis extendida como la glicólisis reducida presentan biestabilidad para cierto rango de parámetros. Además, ambos módulos presentan pocas conexiones entre ellos. Por lo tanto, es posible que los módulos de glicólisis y apoptosis se comporten de manera relativamente independiente al llegar al estado estacionario. Y la multiplicación de los estados estacionarios, se debería a una combinación entre los estados estacionarios de ambos módulos.

Tabla 1: Resultados obtenidos a partir del cálculo de los estados estacionarios para dos de los valores de BAK utilizados en las simulaciones. Puede apreciarse claramente que para cada valor de concentración posible de C3*, hay tres valores posibles de concentración para F16BP y viceversa. El color verde implica el estado de baja concentración, azul/celeste de alta y rojo el estado inestable

BAK	C3a	F16BPc
0	0,058356	81394,96
0	0,058356	2517419
0	0,058356	32694767
0	7,162475	81394,96
0	7,162475	2517419
0	7,162475	32694767
0	48,14328	81394,96
0	48,14328	2517419
0	48,14328	32694767
0,06	69,92703	84108
0,06	69,92703	2335321
0,06	69,92703	32696787
0,06	4,391683	84108
0,06	4,391683	2335321
0,06	4,391683	32696787
0,06	0,087936	84108
0,06	0,087936	2335321
0,06	0,087936	32696787

Esto puede observarse en las tablas de datos obtenidas a partir del análisis de estado estacionario del sistema. Se observan claramente para cada valor de parámetro (BAK) nueve estados posibles, pero que cada variable solo toma tres valores distintos. Sin embargo, puede verse en la Tabla 1, que para cada valor de C3* (variable desencadenante de la apoptosis), existen tres valores posibles de F16BPc, (variable representativa de la glicólisis) y viceversa.

Lo mismo puede observarse en los gráficos de la Figura 31, donde, si para cada uno de los estados de C3* se grafican los valores de F16BPc, se obtienen curvas con biestabilidad para los tres valores estacionarios posibles para C3*. Lo mismo ocurre si se grafican los estados posibles de C3* para cada uno de los valores de F16BP.

Como conclusión, podemos decir efectivamente que la multiplicación de estados estacionarios en el Modelo integrado, puede explicarse por la combinatoria de los estados estacionarios de la glicólisis y los de la apoptosis. Desde el punto de vista del funcionamiento celular, lo que nos va a interesar principalmente son los estados estables, ya que los inestables son empíricamente inobservables debido a las fluctuaciones de las concentraciones celulares. Entonces, dado que los módulos de glicólisis operan de manera independiente, podemos pensar que el sistema puede operar de tal manera que haya apoptosis activa con flujo alto o bajo de la glicólisis, así como apoptosis inactiva, con flujo alto o bajo de la glicólisis. Esto se ve reflejado en la tabla 1, donde vemos que para cada valor del parámetro, hay un total de cuatro estados que son combinaciones de estados estables, y que por tanto son estables.

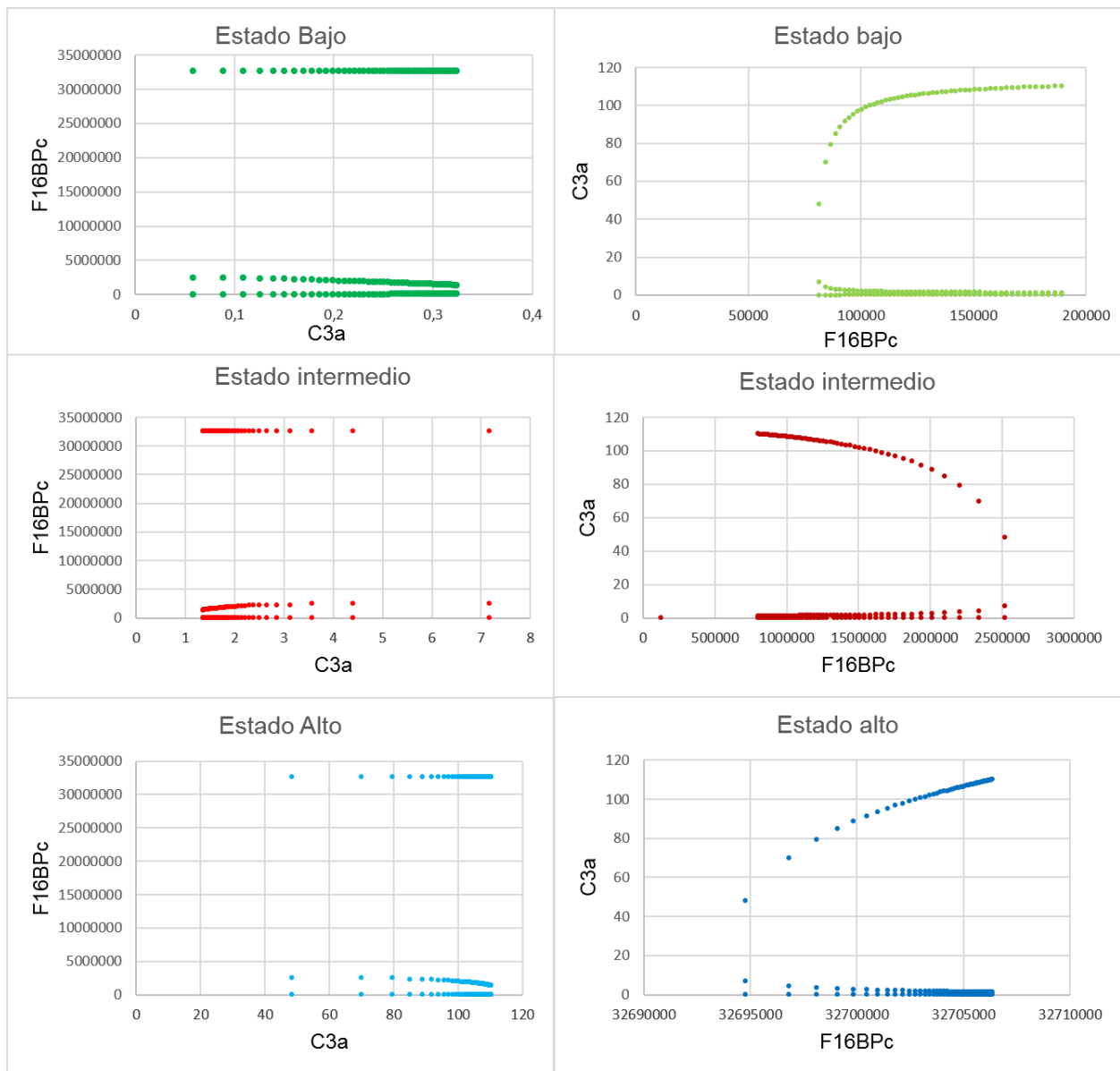


Figura 31: A la izquierda, vemos como para cada estado de concentración de $C3^*$, existen tres valores posibles de concentración para F16BPc. A la derecha, se aprecia como ocurre algo análogo. Cuando se toma cada uno de los estados de de concentración de F16BPc, se observan tres estados posibles para $C3^*$.

3.3) Estudio de la irreversibilidad de la apoptosis

3.3.1) Modelo de apoptosis de Legewie et al.

Uno de los principales objetivos del trabajo, es entender el punto de no retorno y la reversibilidad en la apoptosis. Entonces, estudiamos qué ocurre con la cantidad y estabilidad de los estados estacionarios cuando el estímulo apoptótico es cero. Si, cuando el estímulo apoptótico es cero, el sistema es biestable o presenta un único estado de alto valor de $C3^*$, la apoptosis es irreversible. Notar que esto implica que luego de desaparecido el estímulo apoptótico, seguirá habiendo caspasa activa en la

célula. Entonces, para este modelo, la apoptosis seguiría activa, haciéndola de cierto modo irreversible.

De manera de tener un costo computacional razonable, inicialmente se decidió aplicar el análisis sobre modelo de Legewie, realizando diagramas de bifurcación para cada uno de los parámetros del modelo en $A^*_{tot}=0$.

Al realizar el análisis de los parámetros del sistema, en la mayoría de los casos, variar el parámetro, multiplicándolo y dividiéndolo por 10, no tiene un efecto apreciable sobre el comportamiento estacionario del sistema (Figura 32). Esto implicaría que no sería posible modular el comportamiento del sistema a través de estos parámetros. Si lo vemos con un ejemplo más práctico, supongamos que la apoptosis está activa en una célula y luego de desaparecido el estímulo, la misma intenta revertir el proceso de muerte. Entonces, podría intentar, por ejemplo, aumentar la inhibición sobre el complejo apoptótico A^*C9^* vía XIAP (aumentando k_{12}) y promoviendo la degradación del complejo A^*C9^*X (aumentando k_{28}), de esta forma depletando el pool de moléculas activadores. Sin embargo, en base a este análisis, estas acciones no tendrían ningún efecto sobre el nivel de activación, ya que no afectarían el comportamiento estacionario en $A^*_{tot}=0$.



Figura 32: Diagrama de bifurcación genérico para los parámetros cuya variación no afecta significativamente el comportamiento del sistema en el estado estacionario. Este corresponde a los parámetros: $k_1, k_{1r}, k_3, k_5, k_7, k_8, k_{8r}, k_{9r}, k_{10}, k_{10r}, k_{12}, k_{12r}, k_{13}, k_{13r}, k_{14}, k_{14r}, k_{16}, k_{16r}, k_{20}, k_{21}, k_{27}, k_{28}$. Para las constantes k_9, k_{11r} y k_{25} , si bien hay pequeñas variaciones en los valores en estado estacionario, al igual que para las constantes mencionadas anteriormente, para todo el rango de valores, el sistema es biestable.

Sin embargo, un grupo de 15 parámetros afecta el comportamiento estacionario cuando se modifica su valor. A su vez, dentro de estos parámetros pueden observarse distintos comportamientos dependiendo de si se aumenta o disminuye su valor.

3.3.2) Parámetros que al aumentar su valor presentan un único estado estacionario de alto valor de $C3^*$ para $A^*_{tot} = 0$.

Existen dos parámetros, k_2 y k_{18} , para los cuales, al aumentar su valor, se obtiene un único estado estacionario de alto valor de $C3^*$ (Figura 33). Es decir, si se aumentan lo suficiente estos parámetros, puede asegurarse que la apoptosis será irreversible (Figura 34), aún frente a grandes fluctuaciones de las concentraciones de caspasas. Estos resultados son bastante razonables, ya que k_2 es la tasa de una de las

reacciones de activación de C3 y k18 es la tasa de degradación de XIAP. Esto implica que aumentar el valor de estos parámetro, debería tener un efecto proapoptótico, lo que se evidencia claramente en los diagramas Figuras 33 y 34, donde vemos que, aumentando por ejemplo k2, lleva a tener un único estado estacionario de alto valor de C3*.

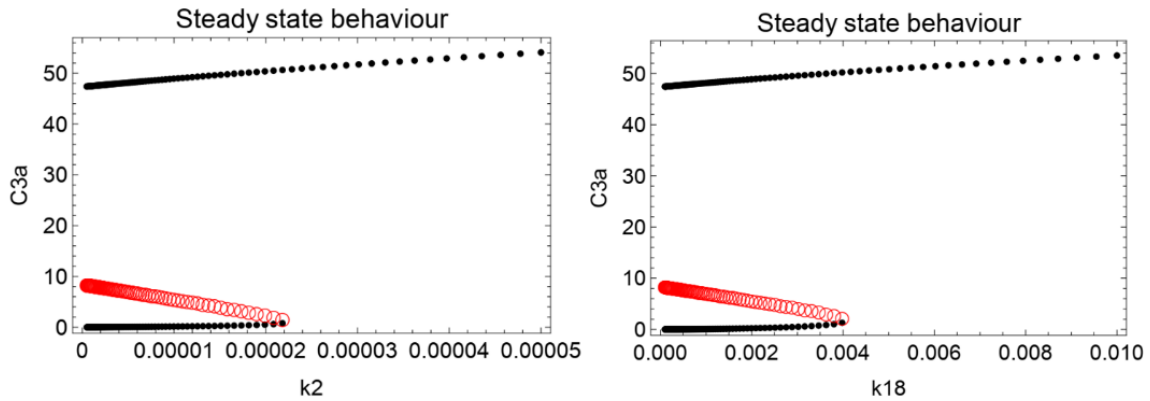


Figura 33: Diagramas de bifurcación para los parámetros que permiten obtener un único estado estacionario de alto valor de C3* al aumentar su valor.

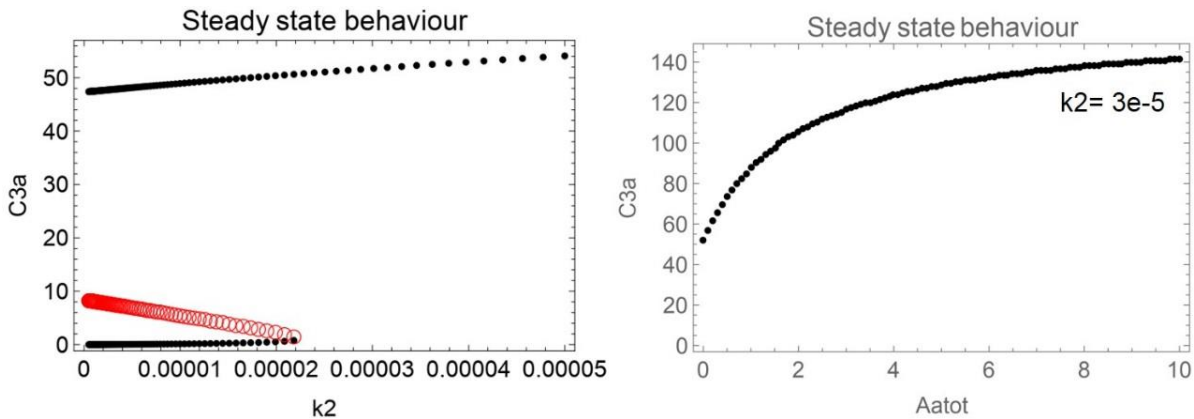


Figura 34: Diagrama de bifurcación en función de k2 vs Diagrama de bifurcación en función de A*_{tot}. Vemos que para valores altos de este parámetro, existe un único estado estacionario, que tiene un alto valor de C3* en A*_{tot}=0 (izquierda). Si utilizamos un valor de k2 alto en el diagrama de bifurcación en función de A*_{tot}, la activación de la apoptosis pasa a ser inevitable (derecha)

3.3.3) Parámetros que al disminuir su valor presentan un único estado estacionario de bajo valor de C3* para A*_{tot} = 0.

Para las constantes cinéticas k4, k6, k15 y k24, cuando se disminuye su valor, se ve como a partir de cierto punto, el sistema presenta un único estado estacionario de bajo valor de C3* (Figura 35). Esto implica que, si por algún mecanismo alguno de estos cuatro parámetros se viera disminuido lo suficiente, esto haría que la apoptosis dejara de ser irreversible.

Que haya un único estado estacionario de bajo valor de C3* en A*_{tot} cero o muy bajo, implica que la desaparición del estímulo luego de un cierto tiempo hace que la concentración de caspasa 3 activa, vuelva a valores cercanos a cero. En otras palabras, la activación de C3 sería reversible. Cabe destacar que, desde el punto de vista fisiológico, es importante considerar el tiempo por el cual las caspasas están

activas, así como el tiempo que tardaría en realidad la concentración en caer. Por ejemplo, es posible que rápidamente al desaparecer el estímulo, desaparezca $C3^*$. Pero si esta estuvo presente el suficiente tiempo para que el avance del fenotipo apoptótico no se pueda revertir, la célula probablemente muera. Sin embargo, esto debe analizarse a partir de los cursos temporales.

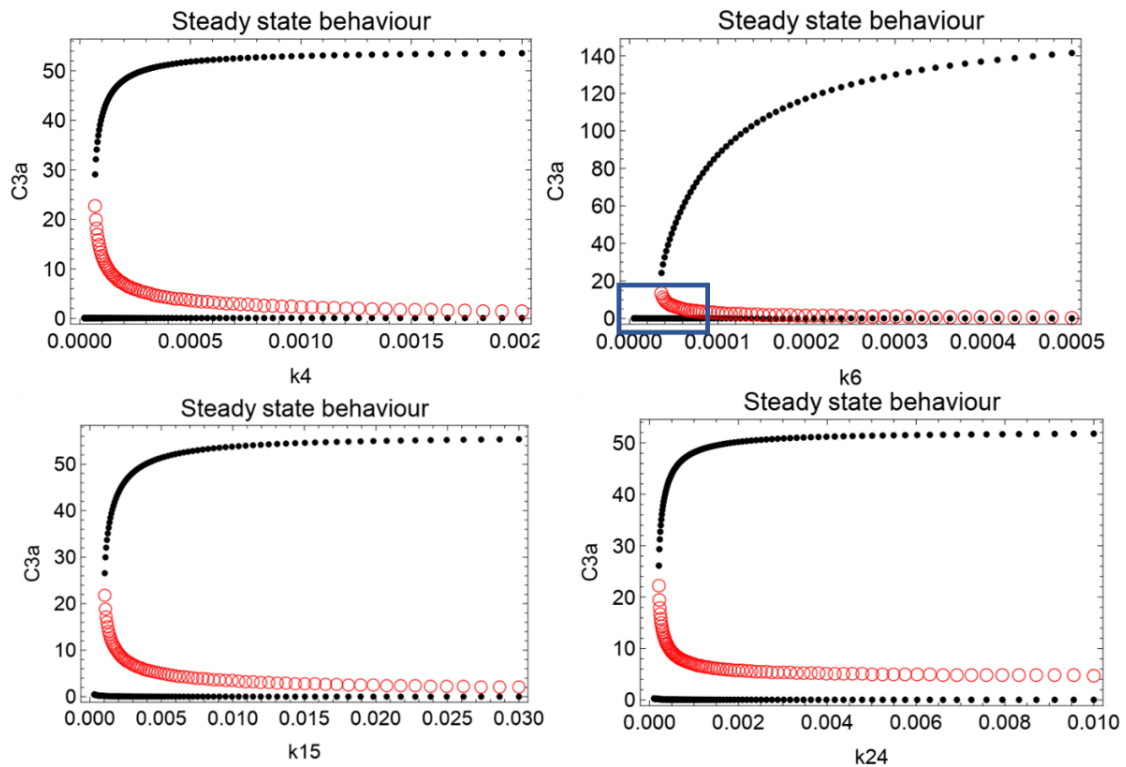


Figura 35: Diagramas de bifurcación para los parámetros que permiten obtener un único estado estacionario de bajo valor de $C3^*$ al disminuir su valor. El efecto puede verse más claramente en el gráfico de $k6$ (marca azul)

Es coherente que estos parámetros tengan esta característica, debido a lo que las correspondientes reacciones representan en el modelo. Por ejemplo, $k4$ y $k6$ son constantes relacionadas con la activación de $C9$ y $C3$, por lo tanto, tiene sentido que la disminución de su valor haga que el sistema tienda hacia un estado de baja caspasa 3 activa. Claramente vemos que cuando se disminuye $k6$, se observa un único estado estacionario de bajo valor de $C3^*$. Si extrapolamos esta información al diagrama de bifurcación en función de A^*_{tot} , vemos que efectivamente al disminuir suficiente el valor de $k6$, la apoptosis pasa a ser reversible (Figura 36)

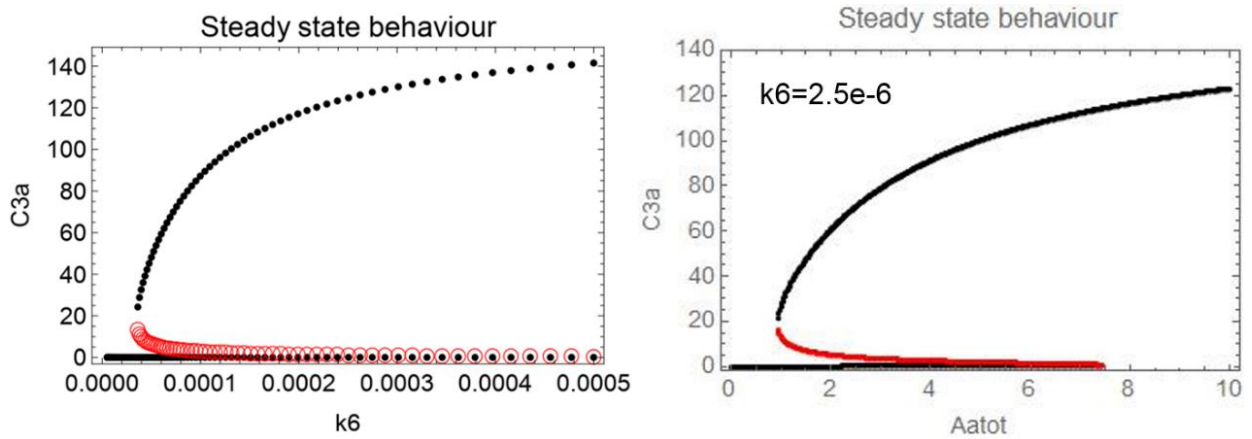


Figura 36: Diagrama de bifurcación en función de k_6 vs Diagrama de bifurcación en función de A^*_{tot} . Vemos que para valores bajos de este parámetro, existe un único estado estacionario de bajo valor de $C3^*$ en $A^*_{tot}=0$ (izquierda). Si utilizamos un valor de k_6 bajo en el diagrama de bifurcación en función de A^*_{tot} , la activación de la apoptosis pasa a ser reversible (derecha)

3.3.4) Parámetros que al aumentar su valor presentan un único estado estacionario de bajo valor de $C3^*$ para $A^*_{tot} = 0$.

En este caso, el comportamiento es similar al anterior, con la diferencia de que para obtener un único estado de bajo valor de $C3^*$, el parámetro debe aumentar su valor. Las constantes que tienen esta dinámica son k_{11} , k_{15r} , k_{17} , k_{22} , k_{23} y k_{26} , y análogamente a lo que ocurría en el caso anterior, al aumentar lo suficiente cualquiera de estos parámetros, la apoptosis dejaría de ser irreversible (Figura 37). Nuevamente obtenemos un resultado razonable. Por ejemplo, si aumentamos k_{23} , la tasa de degradación de $C3^*$, esperamos que esto tenga un efecto antiapoptótico sobre el sistema. Esto lo vemos claramente en la Figura 37, donde al aumentar k_{23} , observamos un único estado estacionario en $A^*_{tot}=0$, donde la concentración de $C3^*$ es muy baja.

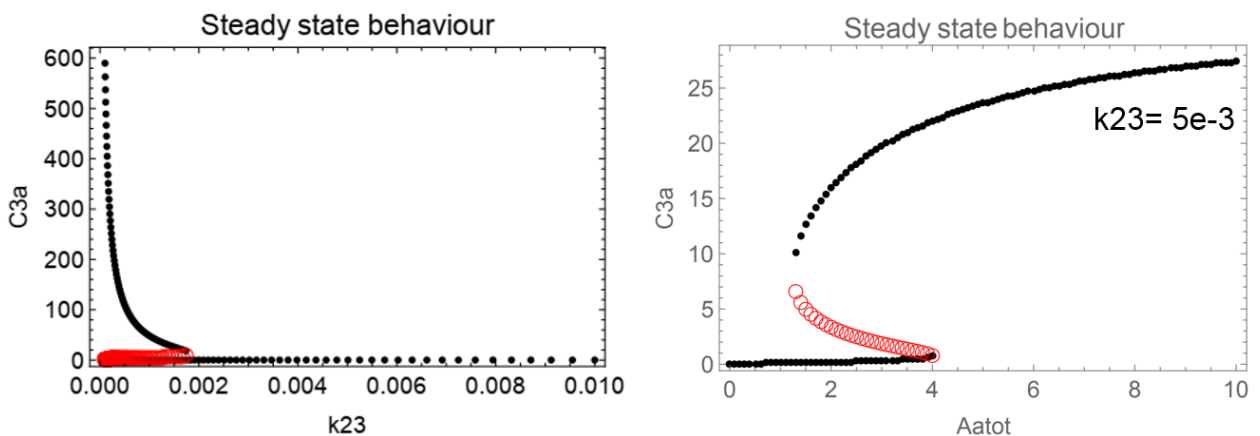


Figura 37: Diagrama de bifurcación para la constante k_{23} (tasa de degradación de $C3^*$). Representa el comportamiento de los parámetros para los cuales si se aumenta su valor, el sistema pasa a tener un único estado estacionario de bajo valor de $C3^*$ (izquierda). A su vez, si utilizamos un valor de k_{23} alto en el diagrama de bifurcación en función de A^*_{tot} , la activación de la apoptosis pasa a ser reversible (derecha)

3.3.5) Parámetros para los cuales tanto para valores altos y bajos, el sistema presenta un único estado estacionario de $C3^*$ para $A^*_{tot} = 0$.

Finalmente, las constantes cinéticas $k17r$, $k18r$ y $k22r$, que corresponden a las tasas de síntesis de $C9$, X y $C3$ presentan un comportamiento doble. Por un lado, para $k17r$ y $k22r$ tenemos que, si se disminuye su valor, existe un único estado estacionario de bajo valor de $C3^*$. Mientras, si se aumenta su valor, se obtiene un único estado estacionario de alto valor de $C3^*$. Sin embargo, para $k18r$ ocurre lo contrario, al aumentar su valor se tiene un único estado de bajo valor y al disminuirla un único estado de alto valor de $C3^*$ (Figura 38).

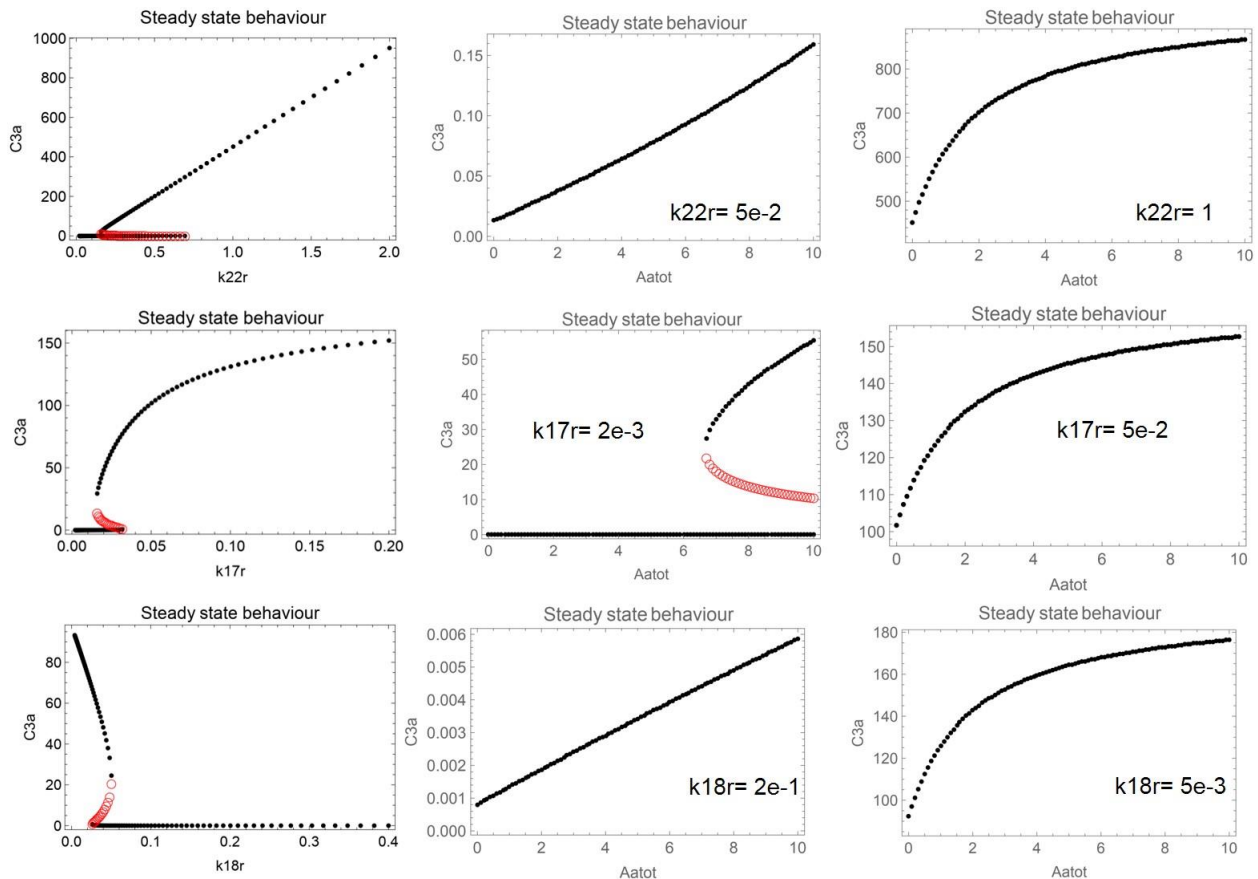


Figura 38: Diagramas de bifurcación correspondientes a los tres parámetros con mayor influencia sobre el comportamiento del sistema (**Izquierda**). En todos los casos se probó aumentar y disminuir por diez el valor del parámetro con respecto al valor de referencia. Valores de referencia: $k17r=2e-2$; $k18r=4e-2$; $k22r=2e-1$. Los parámetros correspondientes a las tasas de síntesis pueden variarse en rangos razonables y obtener un solo estado estacionario de alto o bajo valor de $C3^*$, así como biestabilidad. En el carril central (**Centro**) de la figura vemos a su vez como modificando los parámetros del sistema en el sentido que indican los diagramas de bifurcación se puede lograr que la apoptosis sea reversible (en $A^*_{tot}=0$ hay un único estado estacionario de bajo valor de $C3^*$). Se debe aumentar $k18r$ o disminuir $k17r$ o $k22r$. (**Derecha**) Podemos ver que al variar adecuadamente los parámetros la apoptosis pasa a ser inevitable, disminuyendo $k18r$ o aumentando $k17r$ o $k22r$. Cabe destacar que para obtener los diferentes comportamientos es suficiente con variar los parámetros un orden de magnitud o menos.

De cierta forma, estos tres parámetros son los más interesantes, ya que cada uno de ellos individualmente puede variarse para obtener reversibilidad o irreversibilidad en la activación de la apoptosis. Por ejemplo, si se logra que para $A^*_{tot}=0$ el sistema presente un único estado de alto valor de $C3^*$, esto implicaría que, al desaparecer el estímulo, seguirá habiendo caspasa 3 activa, y por lo tanto que la activación sería

inevitable. En suma, puede lograrse que la apoptosis sea irreversible aumentando la tasa de síntesis de las caspasas 3 ó 9, o disminuyendo la tasa de síntesis de XIAP.

Parece razonable que los principales parámetros que regulan la activación de la apoptosis sean la tasa de síntesis de las caspasas y la del inhibidor XIAP. Puede pensarse que la regulación sobre las constantes cinéticas se relaciona con la regulación de la expresión génica de la apoptosis. De esta forma, tiene sentido que se vea una fuerte regulación a nivel de la tasa de síntesis de los principales componentes de la vía intrínseca de la apoptosis, independientemente de a qué nivel de la expresión génica ocurre. Cabe destacar, que los niveles intracelulares de una proteína en particular, depende globalmente de su tasa de síntesis. En general, uno de los niveles de regulación principales en la expresión de proteínas es la regulación de la tasa de transcripción de su mensajero. Por lo tanto, si bien la tasa de síntesis puede ser regulada a muchos niveles (por ejemplo, transporte y modificaciones postranscripcionales del mensajero, tasa de transcripción, modificaciones postraduccionales, degradación, y más) una buena aproximación para estudiar los niveles de proteína celulares es estudiar la regulación de la transcripción.

3.3.6) Modelo de Apoptosis extendida

Primeramente, se analizaron los parámetros correspondientes al módulo de activación; k_{1L} , k_{1Lr} , k_{2L} , k_{2Lr} , k_{3L} , k_{3Lr} , k_{4L} , k_{4Lt} , k_{5L} , k_{5Lr} , k_{6L} , k_{6Lr} , k_{7L} , k_{7Lr} , k_{8L} , k_{8Lr} , k_{9L} , k_{10L} , k_{11L} , k_{11Lr} . No se encontró que ninguno de ellos tuviera un efecto si se multiplica o divide por diez su valor. Es decir, se obtiene un diagrama de bifurcación genérico análogo al de la sección 3.3.1 (Figura 32). Es decir, la regulación de la reversibilidad de la apoptosis está concentrada en el módulo correspondiente al modelo de Legewie et al.

A su vez, los parámetros que no presentaban efecto para el modelo de Legewie et al. (mencionados en la sección 3.3.1) tampoco parecen tener efectos significativos cuando se incorpora el módulo de activación.

Finalmente, el conjunto de 15 parámetros que tienen efecto sobre el comportamiento estacionario del sistema, tienen el mismo efecto cualitativo y un efecto cuantitativo muy similar al observado en el modelo de Legewie et al. En otras palabras, si bien se incorporan varios componentes reguladores de la apoptosis, la mayor sensibilidad del sistema sigue estando en las tasas de síntesis de sus componentes básicos, las caspasas 3 y 9, y XIAP.

3.3.7) Análisis de cursos temporales

Para continuar con el estudio, nos centramos en las constantes cinéticas cuya variación logra que el sistema presente un único estado de bajo valor de $C3^*$, ya que estas pueden revelar mecanismos para lograr que la apoptosis sea reversible.

La idea de utilizar cursos temporales fue partir del estado de $C3^*$ alta, que se obtiene de los diagramas de bifurcación, y simular que ocurre si en un tiempo determinado, se

varía el valor del parámetro. En otras palabras, determinar si variando el parámetro elegido de la manera que corresponda, se logra que el sistema evolucione hacia un estado de $C3^*$ baja. El protocolo consiste en comenzar la simulación con todas las variables en un valor de concentración compatible con el estado de activación de la apoptosis. En cierto momento, un parámetro elegido es modificado y se observa la evolución temporal del sistema en respuesta a dicha perturbación. Si la variación del parámetro logra sacar al sistema del estado de $C3^*$ alto, implica que modular ese parámetro sería útil para revertir la activación.

De los parámetros considerados, la mayoría no logran el efecto deseado, ya sea porque no tienen efecto o porque se requiere una gran variación para ver efectos moderados (Figura 39, 40). Por ejemplo, vemos que disminuir la producción de $C3^*$ (disminuyendo $k4$ y $k6$ drásticamente) no tiene ningún efecto sobre el estado del sistema (Figura 39).

Sin embargo, para las constantes $k17r$, $k18r$, $k22$, $k22r$, $k23$, $k26$, se ve que al variar su valor un orden de magnitud, tienen un efecto significativo y al variarlo más, se logra que el sistema evolucione de un alto valor de $C3^*$ a casi cero (Figura 41). Esto es muy interesante. Primero, recordemos que $k17r$ es la tasa de síntesis de $C9$, $k18$ la tasa de síntesis de X y $k22r$ la tasa de síntesis de $C3$. Además, tenemos que $k22$ es la tasa de degradación de $C3$, $k23$ es la tasa de degradación de $C3^*$ y $k26$ la tasa de degradación de $C9^*$. Es decir, que nuevamente la mejor manera de modular la reversibilidad de la activación de la apoptosis parece ser regular las tasas de síntesis y degradación de sus principales componentes.

Tal y como se apreciaba a partir de los diagramas de bifurcación, el mayor efecto lo causan las constantes $k17r$, $k18r$ y $k22r$. Entonces, podemos concluir que una forma que el sistema tiene de hacer que la apoptosis sea reversible o irreversible, es ajustar las tasas de síntesis de los principales componentes de la vía, es decir, caspasas 3 y 9, y XIAP

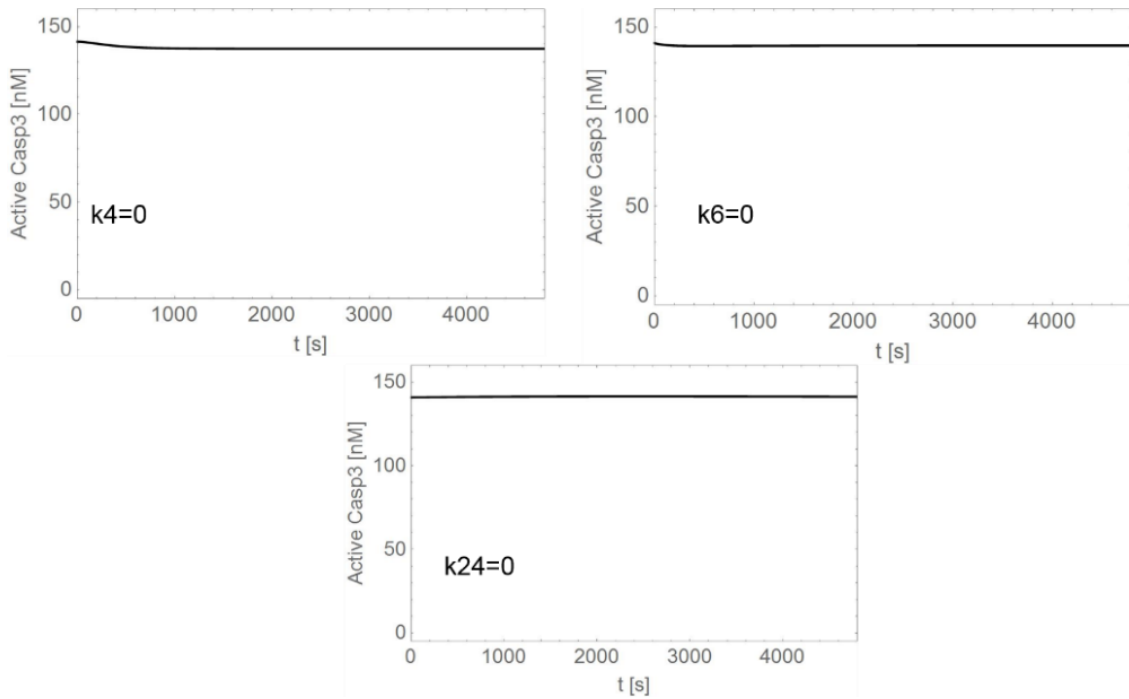


Figura 39: Cursos temporales para parámetros cuya variación no afecta apreciablemente la concentración de C3. Para obtener estos gráficos, se utiliza como condición inicial el estado estacionario alto para todas las variables y al comenzar la simulación se cambia el valor del parámetro correspondiente desde su valor de referencia al indicado en la gráfica. Se observa qué ocurre con la concentración de caspasa 3 activa a lo largo del tiempo. Valores de referencia de los parámetros $k4=2e-4$; $k6=5e-5$; $k24=1e-3$; $A^*_{tot}=10$.

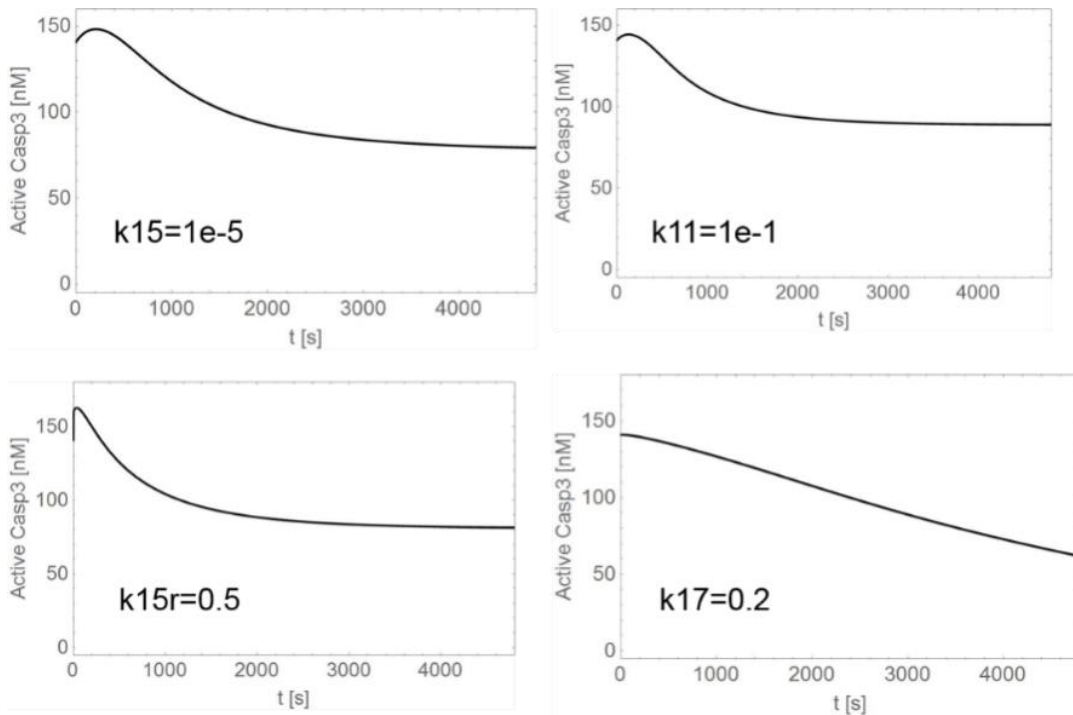


Figura 40: Parámetros cuya variación logra disminuir la concentración de $C3^*$, pero se requiere un cambio de varios órdenes de magnitud. Para obtener las curvas se utilizó un procedimiento análogo al detallado en la Figura 39. Valores de referencia de los parámetros: $k11=1e-3$; $k15=3e-3$; $k15r=1e-3$; $k17=1e-3$; $A^*_{tot}=10$.

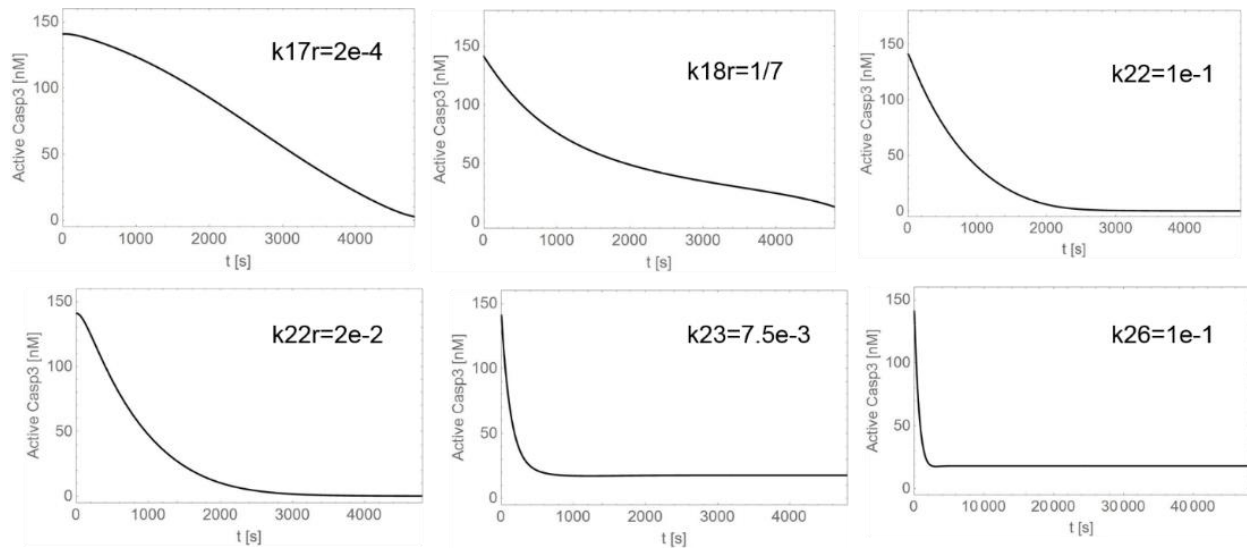


Figura 41: Parámetros cuya variación de uno o dos órdenes de magnitud logra una caída significativa en la concentración de C3*. Una variación mayor hace que la concentración caiga a cero. Para obtener las curvas se utilizó un procedimiento análogo al detallado en la Figura 39. Valores de referencia de los parámetros: $k_{17r}=2e-2$; $k_{18r}=4e-2$; $k_{22}=1e-3$; $k_{22r}=2e-1$; $k_{23}=1e-3$; $k_{26}=1e-3$; $A^{*tot}=10$.

3.4) Regulación transcripcional vía E2F

En función de los resultados obtenidos hasta el momento, decidimos estudiar la regulación de las tasas de síntesis de los componentes de la apoptosis, en particular a nivel transcripcional. Como se mencionó anteriormente, además de sus efectos sobre la progresión del ciclo celular, el factor de transcripción E2F tiene dos mecanismos principales de regulación sobre la activación de la apoptosis. Por un lado, afecta la producción de las caspasas 3 y 9, y de Apaf-1 al regular la tasa de transcripción de sus respectivos mensajeros. Por otro, afecta indirectamente la activación de la vía intrínseca al promover la activación de p53, vía la activación de ARF, inhibidor de Mdm2, que a su vez es un inhibidor de p53. Por lo tanto, decidimos incorporar en el modelo el efecto activador de E2F, para analizar cómo afecta la reversibilidad de la apoptosis.

3.4.1) Efecto de E2F sobre la síntesis de elementos de la apoptosis

En primer lugar, se decidió incluir el efecto de E2F sobre la síntesis de caspasas, considerando a E2F y a BAK como parámetros del sistema, que representan la intensidad del estímulo apoptótico. Para incorporar la regulación sobre la tasa de síntesis de las caspasas, se decidió incorporar E2F en las constantes de k_{11Lr} , k_{17r} y k_{22r} , de acuerdo con las siguientes relaciones:

$$k_{11Lr} = k_{11Lr}^0 \cdot (1 + a_{11Lr} \cdot E2F)$$

$$k_{17r} = k_{17r}^0 \cdot (1 + a_{17r} \cdot E2F)$$

$$k_{22r} = k_{22r}^0 \cdot (1 + a_{22r} \cdot E2F)$$

donde $k_{11Lr}^0, k_{17r}^0, k_{22r}^0$ son los valores de las constantes cuando la concentración de E2F es cero. Representan valores de las constantes para los cuales el modelo de Legewie et al. tiene un único estado estacionario de bajo valor de $C3^*$. $a_{11Lr}, a_{17r}, a_{22r}$ son parámetros que representan la “intensidad” de la regulación, o sea, cuanto mayor sea su valor, mayor será la sensibilidad de la constante a variaciones en la concentración de E2F. Como en principio no tenemos motivo para decir que hay una sensibilidad diferencial, para todos los “a” se tomó valor 1.

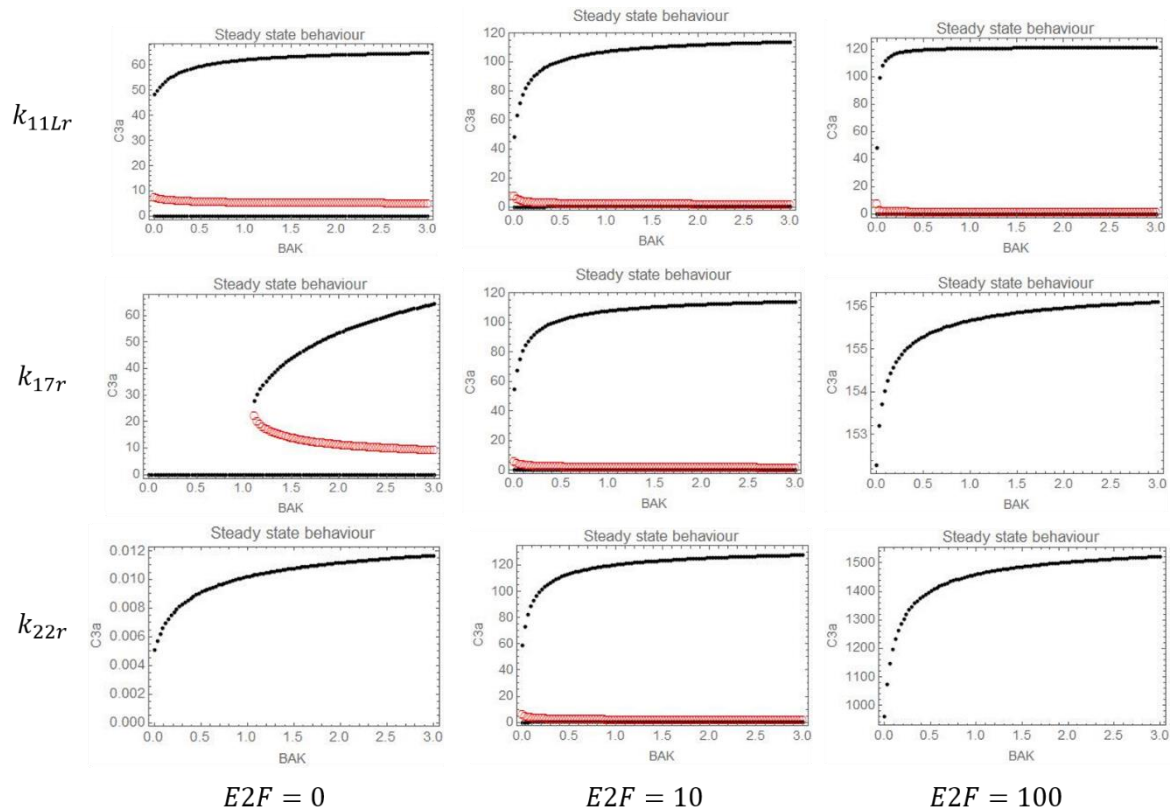


Figura 42: Efecto de la regulación de las tasas de síntesis de los componentes de la apoptosis. Las tres graficas superiores corresponden a regular solamente k_{11Lr} , las tres intermedias solamente k_{17r} y las tres inferiores solamente k_{22r} . k_{11Lr} corresponde a la tasa de síntesis de Apaf-1, k_{17r} a la de caspasa 9 y k_{22r} a la de caspasa 3.

Por un lado, se estudió lo que ocurría si se afectaban las tasas de síntesis que regula E2F de a una a la vez, es decir, dejando las otras en su valor de referencia (valores reportados en el artículo de Legewie et al.)

Observando los resultados obtenidos (Figura 42), podemos ver que para una misma intensidad de regulación de E2F sobre cada una de las tasas de síntesis, el efecto más drástico ocurre cuando se regula la tasa de producción de caspasa 3 (k_{22r}). Para esta tasa, tenemos que para E2F igual a cero o muy bajo hay un único estado de bajo valor de $C3^*$, en valores intermedios de E2F hay biestabilidad y para valores altos de E2F un solo estado de alto valor de $C3^*$.

Se observa un comportamiento similar al regularse la tasa de síntesis de caspasa 9, pero mucho menos acentuada, además de que existe biestabilidad cuando $E2F=0$. Finalmente, al regular la tasa de síntesis de Apaf-1, si bien existen variaciones cuantitativas en cuanto a los valores de los estados estacionarios, cualitativamente se

mantiene un comportamiento biestable para los valores de E2F y el rango de concentraciones de BAK considerados. Podemos decir entonces, que a la hora de regular las tasas de síntesis, el mayor efecto de E2F aparece cuando se regula la tasa de síntesis de caspasa 3.

Seguidamente, integramos la regulación de E2F sobre los tres componentes de la apoptosis al mismo tiempo. Como puede verse en la Figura 43, la regulación que ocurre al modular las tres tasas de síntesis simultáneamente es cualitativa y cuantitativamente similar a la que se observa cuando se modula únicamente la síntesis de caspasa 3.

Finalmente, cuando realizamos el diagrama de bifurcación en función de E2F (Figura 44), regulando las tres tasas de síntesis a la vez, se obtuvo un resultado cualitativamente similar al diagrama de bifurcación de C3* en función de k22r (tasa de síntesis de caspasa 3) para el modelo de Legewie et al. (Figura 38). Puede verse, como se dijo anteriormente, que la activación de la apoptosis regulada por E2F ocurre como un switch, donde para valores muy bajos de E2F no hay activación de caspasas y para valores altos ocurre una drástica activación. Cabe destacar que, en este contexto, el rango de biestabilidad es relativamente acotado. Además, la apoptosis sería un proceso reversible, ya que al desaparecer E2F, la concentración de caspasa 3 activa caería a valores cercanos a cero, al menos en términos estacionarios. En la práctica, se debe considerar el factor temporal, entre otras cosas el tiempo que es necesario que estén activas las caspasas efectivamente para que una célula muera por apoptosis.

Resumiendo lo observado, tenemos que E2F podría funcionar como un switch, ya que variaciones razonables de su concentración permite o no la activación de la apoptosis. Además, el efecto parece darse principalmente a través de la regulación de la tasa de síntesis de caspasa 3.

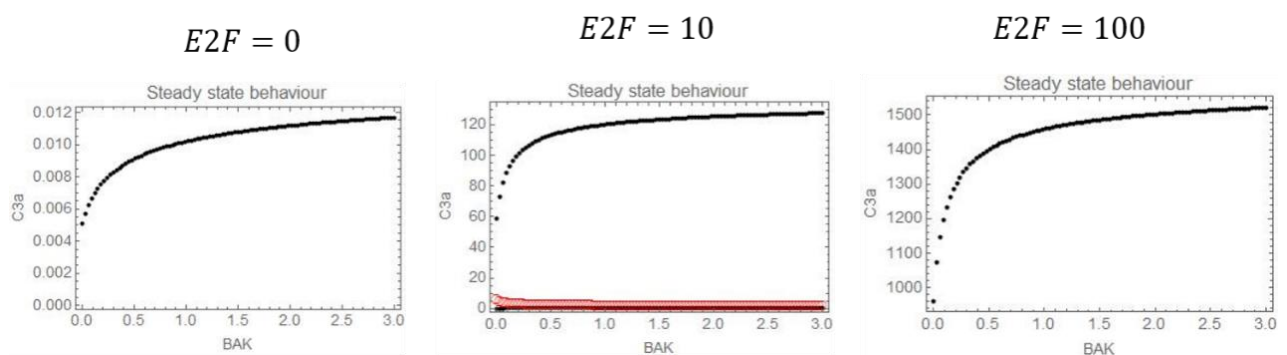


Figura 43: Regulación simultánea de la tasa de síntesis de las caspasas 3 y 9, y Apaf-1

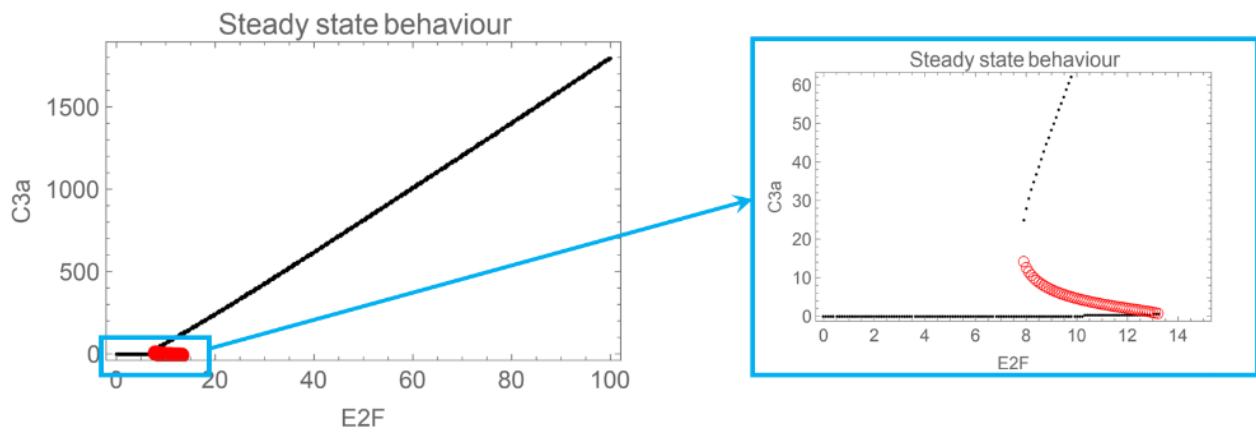


Figura 44: Diagrama de bifurcación de $C3^*$ vs $E2F$, con $E2F$ regulando simultáneamente la síntesis de *Apaf-1* y las caspasas 3 y 9. $BAK = 1 \times 10^{-12} \text{ nM}$

3.4.2) Activación de BAK

Al igual que se estudió el efecto directo de $E2F$ sobre la síntesis de los componentes de la apoptosis, se estudió el efecto indirecto de $E2F$ sobre BAK. Se utilizó una relación sigmoide entre la concentración de BAK y la de $E2F$:

$$BAK = \frac{k_{12Lr} \cdot BAK_{max} E2F^n}{k_{12L} + E2F^n}$$

donde BAK_{max} es el valor máximo que puede alcanzar BAK y, k_{12L} , k_{12Lr} y n son constantes. La elección de esta cinética se debe a que en general la regulación de factores de transcripción es cooperativa, con cinéticas de tipo switch. Decidimos utilizar $n = 6$ para simular una fuerte cooperatividad positiva para el proceso. Además, incorporar otros detalles mecánicos, que no estén basados en información experimental, podría complejizar innecesariamente el sistema.

Al realizar el diagrama de bifurcación, se obtiene que la activación de la apoptosis en función de $E2F$ es biestable e irreversible (Figura 45).

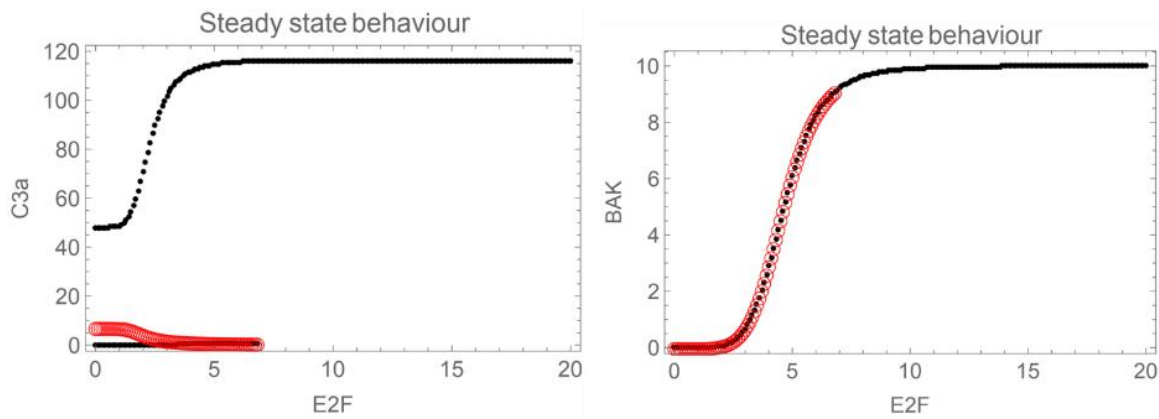


Figura 45: Diagrama de Bifurcación para la activación de la apoptosis en función de E2F. A la izquierda se muestra el diagrama para C3*, y a la derecha, la relación sigmoide entre BAK y E2F. Es importante notar que en esta simulación no se incluye el efecto de E2F sobre las tasas de síntesis de las caspasas 3 y 9, ni de Apaf-1.

3.4.3) Regulación doble de E2F sobre los componentes de la apoptosis

A continuación, realizamos el diagrama de bifurcación considerando el efecto de E2F sobre las tasas de síntesis y sobre la aparición de BAK. Si observamos la Figura 46, vemos que se obtiene un diagrama de bifurcación muy similar cualitativa y cuantitativamente al obtenido cuando se considera sólo el efecto de E2F sobre las tasas síntesis. Nuevamente, vemos un comportamiento en donde, en un rango relativamente acotado de E2F, puede pasarse de tener un único estado de baja concentración de C3* a un único estado de alta concentración de C3*, pasando por una transición con biestabilidad. Es interesante destacar que la apoptosis es irreversible cuando se considera únicamente el efecto de E2F sobre BAK (Figura 45), pero cuando se considera también el efecto de E2F sobre las tasas de síntesis, pasa a ser reversible.

Podemos concluir que, al menos de la manera en que está planteado el modelo, el mecanismo de regulación más fuerte ocurre a nivel de la síntesis de los componentes de la vía intrínseca. Particularmente, parece que el mayor efecto se da a nivel de la caspasa 3. Si pensamos en la lógica de los mecanismos de regulación, parece razonable que exista una potente regulación a nivel de la caspasa 3, ya que es la proteína que efectivamente ejecuta el programa de muerte, siendo el punto de convergencia de las diferentes vías de activación de la apoptosis. Adicionalmente, parece razonable tener una fuerte regulación sobre las tasas de síntesis, ya que esto determina los niveles de caspasas y otros componentes de la apoptosis disponibles para la activación.

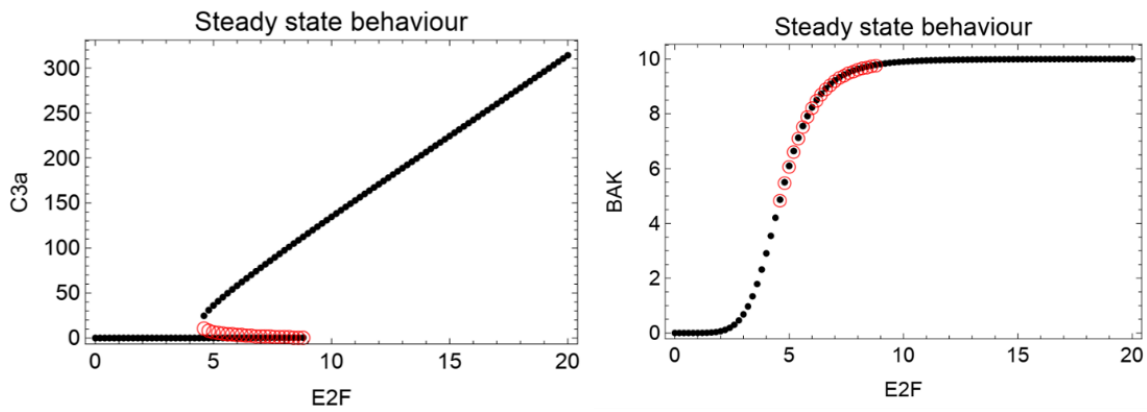


Figura 46: Diagrama de bifurcación para el modelo de apoptosis extendido regulado por E2F. Se considera el efecto tanto sobre la síntesis de las caspasas 3 y 9, y de Apaf-1, así como sobre BAK.

3.5) Simulación de dinámicas temporales

Para comprender mejor el funcionamiento de la vía intrínseca de la apoptosis, realizamos cursos temporales para la activación de la apoptosis. El objetivo de este análisis es determinar qué parámetros de las señales de muerte (intensidad, duración, etc.) determinan las características de la respuesta apoptótica (duración, retardo, cinética de activación, reversibilidad, etc.)

Utilizamos como referencia el curso temporal obtenido por Legewie et al [71], cuyo resultado se aprecia en la Figura 47. Podemos ver que la activación de la vía intrínseca de la apoptosis en este modelo presenta una cinética de switch, donde cuando la cantidad de caspasa 3 activa alcanza un cierto umbral, la activación se dispara. Además, vemos que la intensidad del estímulo (dada por la concentración de A*_{tot}) determina el tiempo que lleva la activación y el valor máximo de concentración de C3* alcanzado. En particular, a menos intensidad del estímulo, se observa un retardo más prolongado y el nivel de activación alcanzado es menor.

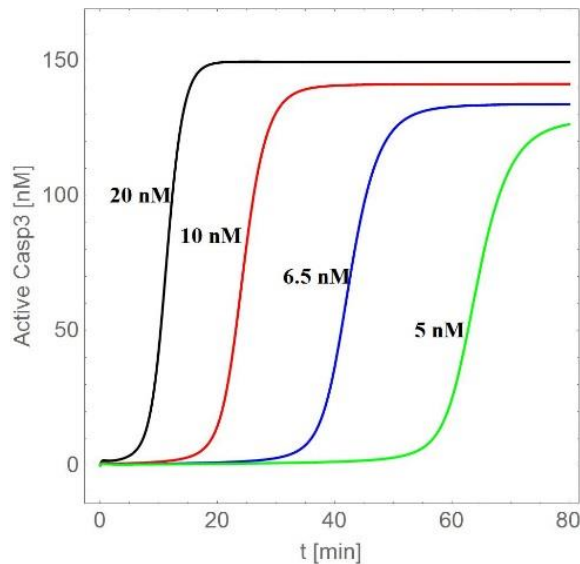


Figura 47: Reproducción de los cursos temporales obtenidos en el trabajo de Legewie et al. [71]. Se grafica la evolución temporal de la concentración de la caspasa 3 activa. A la izquierda de cada curva se indica la concentración de A^{*tot} utilizada en la simulación (la cual representa la intensidad del estímulo apoptótico)

3.5.1) Apoptosis Extendida- BAK como parámetro

Inicialmente realizamos los cursos temporales correspondientes al modelo de Apoptosis extendida, donde BAK se toma como parámetro y es el único elemento que representa la señal de muerte. Entonces, se simularon los cursos temporales variando tanto la concentración de BAK como la concentración inicial de $C3^*$.

Al variar la concentración de $C3^*$ inicial se observó que para bajos valores de concentración, el sistema evoluciona hacia un estado de $[C3a] \approx 0$. Sin embargo, cuando la concentración inicial supera cierto umbral, el sistema queda confinado a un estado de alto valor de $C3^*$. Este resultado implica que, en este modelo, luego de alcanzar el estado de activación, este no puede revertirse. Entonces, la apoptosis sería irreversible, en concordancia con lo que muestran los diagramas de bifurcación mostrados anteriormente.

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos estudiando los estados estacionarios del sistema, lo esperable sería que, si se fija la concentración de C3 en un valor cercano a cero y se toman diferentes valores para BAK, que el sistema pudiera alcanzar dos estados. Uno de alto valor de $C3^*$ compatible con la muerte por apoptosis y otro de bajo valor de $C3^*$ compatible con la sobrevivencia.

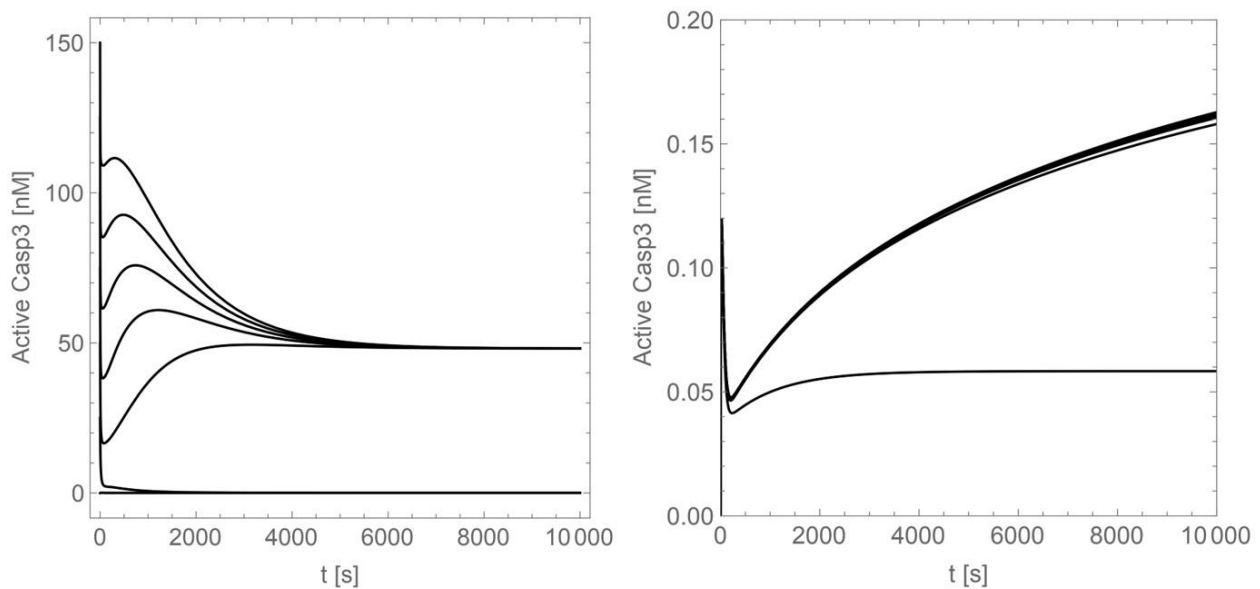


Figura 48: Cursos temporales para la activación de la caspasa 3. **A la izquierda** se muestra el resultado al mantener $BAK = 0$ y tomar valores de concentración inicial de $C3^*$ entre 0 y 150 nM, con intervalos de 10. Puede apreciarse claramente que el sistema puede alcanzar dos estados estacionarios estables dependiendo de la concentración inicial. **A la derecha** se muestra la simulación temporal fijando $[C3^*]_i = 0$ y tomando diferentes valores de BAK entre 0 y 100 nM, también con intervalos de 10. En este caso el sistema solo logra alcanzar estados de concentración baja de $C3^*$.

Sin embargo, tal y como se observa en la Figura 48, independientemente del valor de BAK utilizado como estímulo, no se logra evidenciar activación de la apoptosis. Este resultado parece contradecirse a lo observado en los diagramas de bifurcación, en donde se ve claramente que para todos los valores de BAK, es posible alcanzar ambos estados estables. Este resultado implica que, para este sistema, no es posible desencadenar la apoptosis partiendo de concentraciones de caspasa cercanas a cero, independientemente de la intensidad del estímulo. En otras palabras, en estas condiciones el modelo no sería capaz de describir la activación de la apoptosis, ya que no permite que la caspasa 3 se active cuando se parte de concentraciones bajas de $C3^*$ (condición en la cual normalmente se inicia la apoptosis en una célula)

Entonces, ¿cuál es el motivo de esta discrepancia? Un motivo razonable podría ser que el diagrama de bifurcación no considera el factor temporal en la activación. Por lo tanto, podría ocurrir que las moléculas activadoras que se generan frente a la señal de BAK, A^* , $C9a$, A^*C9 , A^*C9^* , que son las encargadas de activar la caspasa 3, sean degradadas antes de que la concentración de $C3^*$ alcance cierto umbral. Esto significaría, dicho cuantitativamente, que las condiciones iniciales de todas las variables son importantes a la hora de definir hacia qué estado evoluciona el sistema. En particular, los condiciones iniciales de las moléculas derivadas de C9. Este fenómeno podría explicarse debido a que desde que se produce el estímulo por BAK, hasta que se genera A^* suficiente, existe un cierto retardo. Y es probable que en ese tiempo se degrade la caspasa 9 disponible, antes de generar especies activadoras. Entonces si se genera una pequeña cantidad de moléculas derivadas de C9, logra desencadenarse la activación en una escala de tiempo razonable.

Un ejemplo de esto es el resultado observado en la Figura 49. Si bien parte de una concentración razonable de C9 y además se genera la cantidad esperada de A^* , no se observa aparición de otras especies derivadas de C9 (las cantidades de A^*C9 , $C9a$, A^*C9^* son despreciables).

Sin embargo, si modificamos la distribución inicial de las especies derivadas de C9, haciendo que haya pequeñas cantidades de las especies activadoras, vemos que ocurre la activación de C3 (Figura 50). A su vez, las concentraciones estacionarias de A^*C9 y A^*C9^* se estabilizan en valores mucho más bajos que los que se requiere para iniciar la activación. Es interesante el pico que se genera en la concentración de C9, mientras que la aparición de $C9^*$ tiene forma de switch.

Esta evidencia apunta a que no solo es importante que los valores de parámetros utilizados sean compatibles con la biestabilidad, sino que las variables deben estar a cierta distancia del estado estacionario para alcanzarlo. Para observar la activación de la apoptosis es necesario que esta ocurra en un marco temporal adecuado, ya que de otra forma la “potencialidad” del sistema para activarse no se materializa. Es decir, que hace falta un mecanismo adicional que haga que las especies activadores derivadas de C9 se produzcan en un marco temporal adecuado.

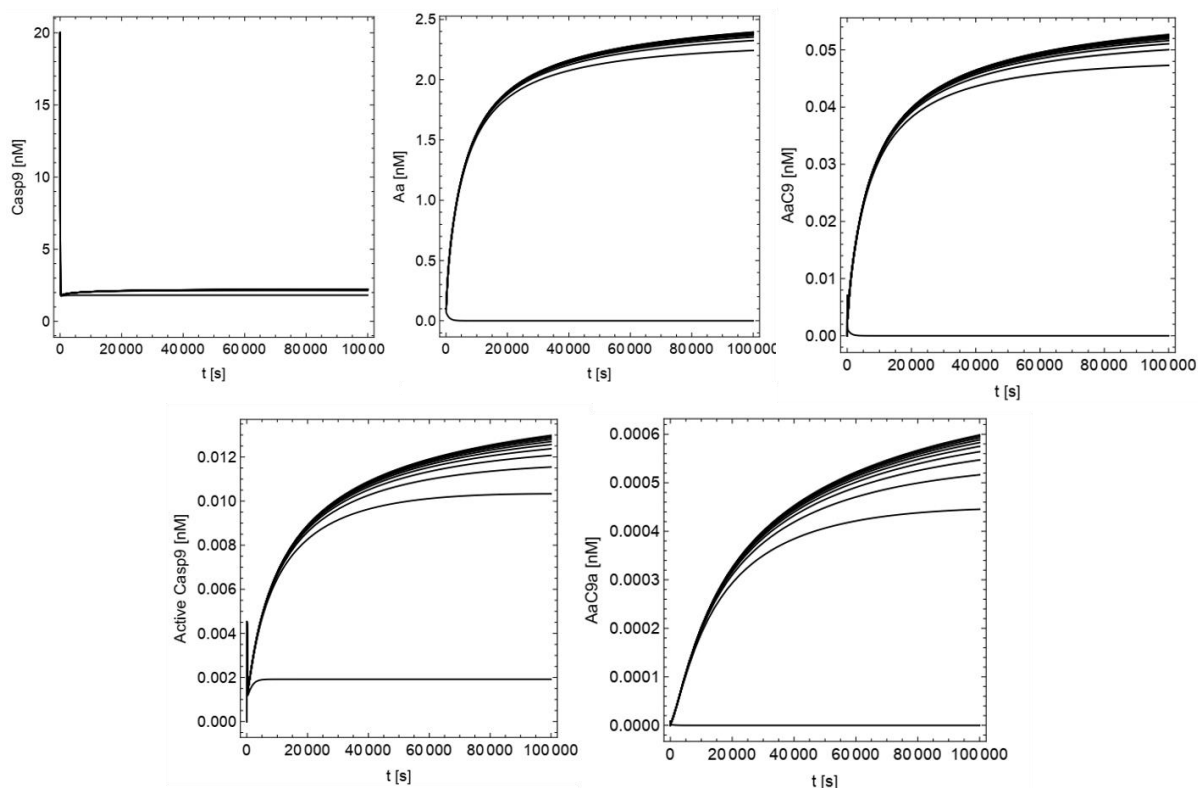


Figura 49: Se muestra la simulación temporal fijando $[C3a]_i = 0$ y tomando diferentes valores de BAK entre 0 y 100 nM, con intervalos de 10. En este caso, se observa que se alcanza la cantidad esperada de A^* , la forma inactiva de C9 desaparece, pero no se observa la aparición de especies activadoras como A^*C9 , $C9^*$ ó A^*C9^* .

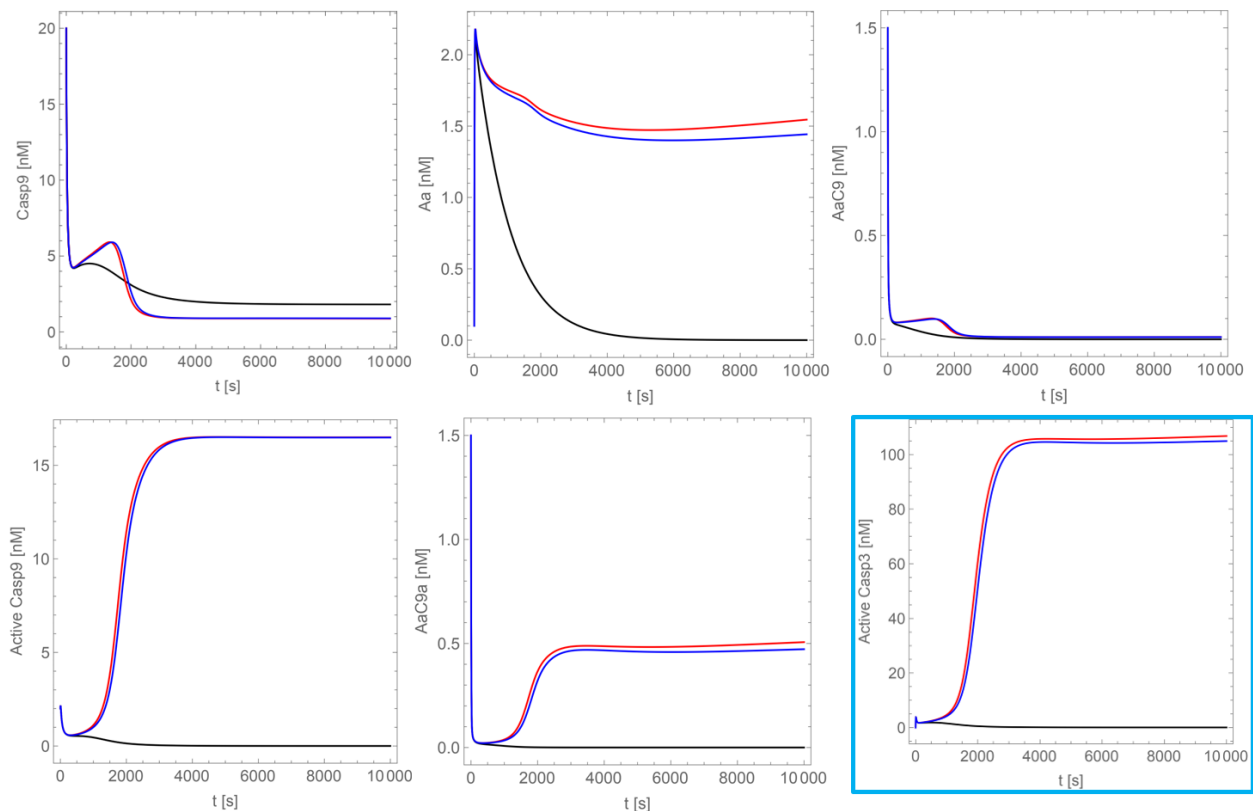


Figura 50: Simulación de los cursos temporales para el modelo de apoptosis extendida con BAK como parámetro. Se mantiene la concentración total de las especies derivadas de C9 en 20 nM, como condiciones iniciales, se empieza con 15 nM de C9 y los restantes 5 nM se distribuye de la siguiente manera: $[C9a]=2$ nM; $[A^*C9]=1.5$ nM y $[A^*C9^*]=1.5$ nM. Los colores de las curvas corresponden a los diferentes valores de BAK utilizados. Negro-> BAK=0; Rojo-> BAK=3; Azul-> BAK=10

3.5.2) Apoptosis extendida – BAK modulado por E2F (parámetro)

En base a lo expuesto en la sección anterior, intentamos determinar si cambiando la cinética de aparición del estímulo apoptótico, era posible generar que el sistema desencadene la apoptosis. Para ello incluimos el efecto indirecto de E2F sobre la síntesis de BAK. Sin entrar en detalles del mecanismo que media el efecto, se le asignó a BAK una cinética de activación cooperativa, utilizando la ecuación de Hill (ver sección 3.4.2) y siendo E2F en este caso el parámetro del sistema que variamos para modificar la intensidad del estímulo. Sin embargo, en este caso tampoco logra observarse activación de caspasa 3 para ningún valor de E2F cuando se parte de un estado de baja concentración de $C3^*$, tal y como se aprecia en la Figura 51. Cabe destacar que si bien la figura muestra el comportamiento hasta $E2F=20$ se probaron valores de E2F hasta 1000 nM sin obtener activación de la apoptosis.

La forma de las curvas, con un pequeño pico inicial que rápidamente se relaja a un estado de baja concentración de $C3^*$ podría indicar que efectivamente el estímulo de activación tiene su efecto, pero de alguna manera este se “disipa” antes de que se desencadene la apoptosis.

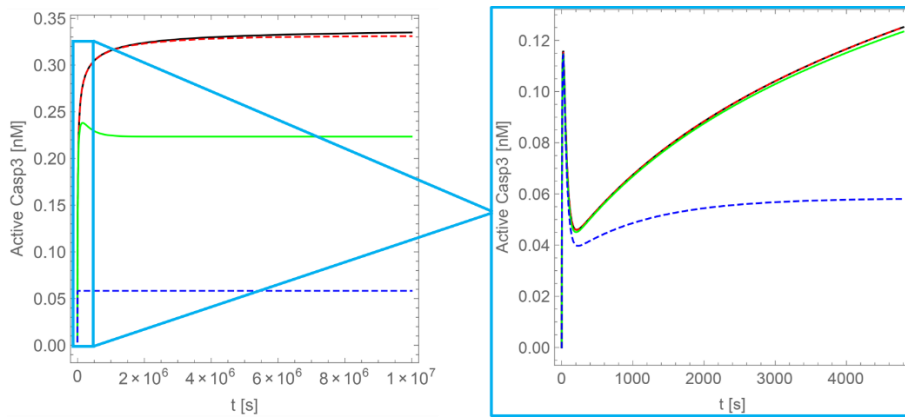


Figura 51: Simulación del curso temporal para la activación de caspasa 3 para el modelo de apoptosis extendida que además considera el efecto de E2F sobre BAK. El color de la curva indica la intensidad del estímulo aplicado. Azul -> E2F=0; Verde -> E2F=5 nM; Rojo -> E2F=15 nM; Negro -> E2F=20 nM. A la izquierda se muestra la simulación completa y a la derecha un zoom para los tiempos iniciales.

Puede realizarse un análisis similar al hecho en la sección anterior, para determinar si efectivamente el motivo por el cual no se observa la activación predicha por el estudio de los estados estacionario es la ausencia de moléculas activadoras derivadas de C9. Observando la Figura 52, vemos un escenario similar al descrito anteriormente. La caspasa 9 se degrada, pero no se generan concentraciones significativas de moléculas activadoras derivadas. Y al igual que en el caso anterior, se logra la activación predicha por el diagrama de bifurcación, cambiando las concentraciones iniciales de las especies derivadas de C9 (Figura 53). Además, al haber utilizado un pulso de E2F, en lugar de mantener su valor constante durante la simulación, se evidencia que el proceso de activación es irreversible.

En suma, podemos ver que no existe en realidad una contradicción entre los resultados obtenidos a partir del diagrama de bifurcación y los cursos temporales, sino que para alcanzar el estado de activación, se deben producir moléculas activadoras de la apoptosis en un tiempo adecuado.

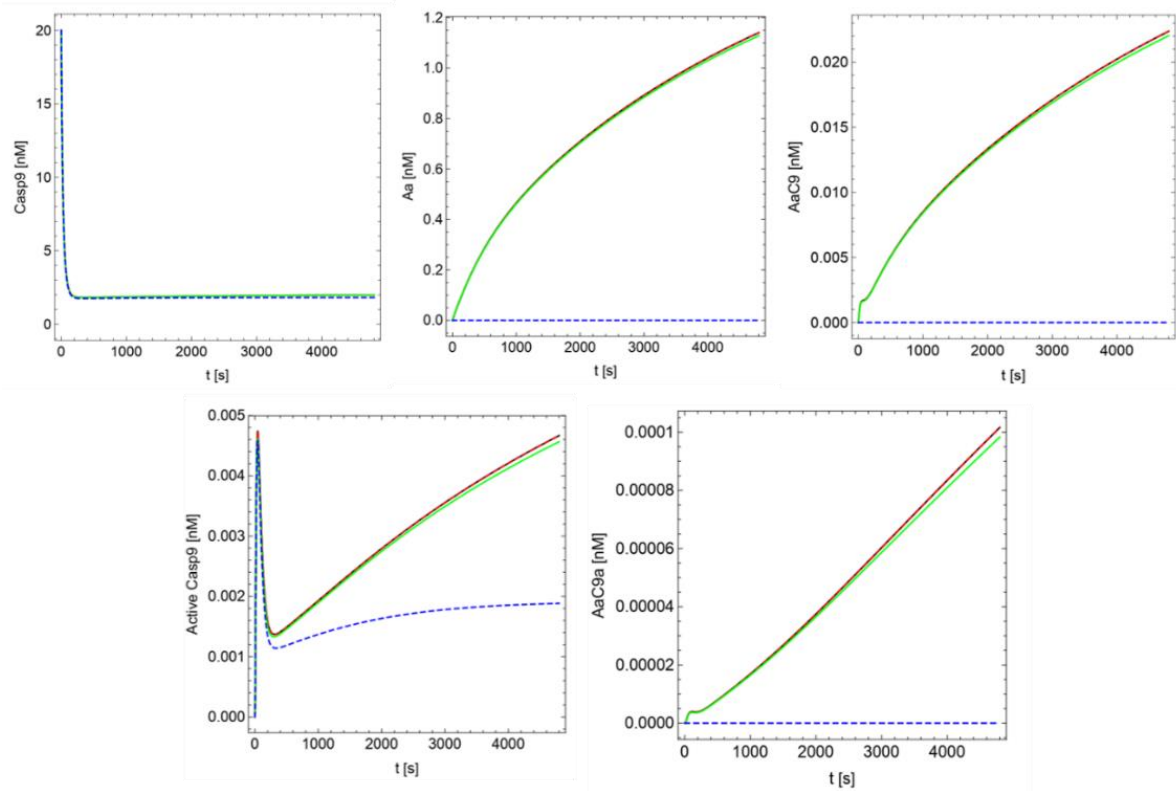


Figura 52: Simulación de cursos temporales para la apoptosis extendida, incluyendo la regulación indirecta de E2F sobre BAK. Los diferentes colores de las curvas indican la concentración de E2F utilizadas: Azul -> E2F= 0; Verde -> E2F=5 nM; Rojo -> E2F= 15 nM; Negro -> E2F=20 nM

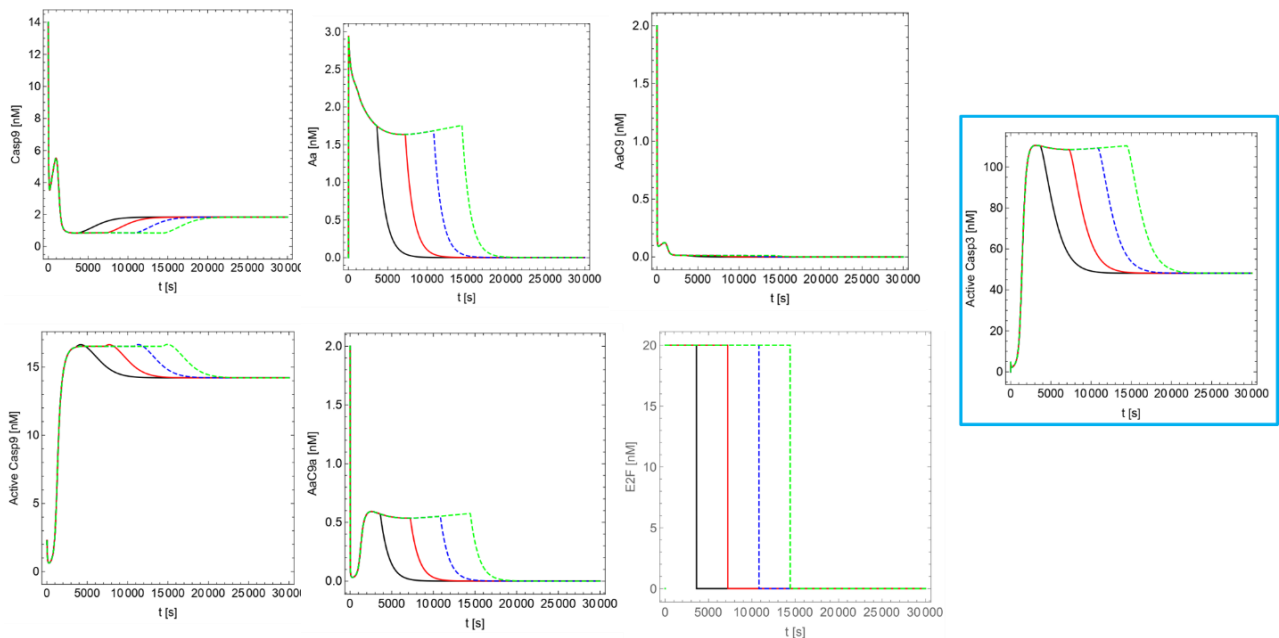


Figura 53: Simulación de cursos temporales para el modelo de apoptosis extendida con la regulación de E2F sobre BAK. Se mantiene la concentración total de las especies derivadas de C9 en 20 nM, como condiciones iniciales, se empieza con 15 nM de C9 y los restantes 5 nM se distribuye de la siguiente manera: $[C9a]=2$ nM; $[A^*C9]=1.5$ nM y $[A^*C9^*]=1.5$ nM En todos los casos se utilizó un pulso de E2F=20 nM, variando la duración de dicho pulso (dt). Verde-> dt=14400 s; Azul-> dt=10800 s; Rojo-> dt=7200 s; Negro-> dt=3600s

3.5.3) Apoptosis extendida-Regulación de la síntesis de caspasas por E2F

Por otro lado, estudiamos el efecto de E2F sobre la síntesis de las caspasas y su incidencia sobre el curso temporal de la activación. En este caso no se incluyó la interacción de E2F sobre BAK (BAK fue tomado como parámetro). El tiempo necesario para que se desencadene la activación de la caspasa 3 y la concentración máxima de caspasa activa alcanzada depende del valor de E2F. Efectivamente, cuanto mayor es la concentración utilizada (mayor intensidad del estímulo), la activación ocurre más rápidamente y la concentración de C3* alcanzada es mayor (Figura 54)

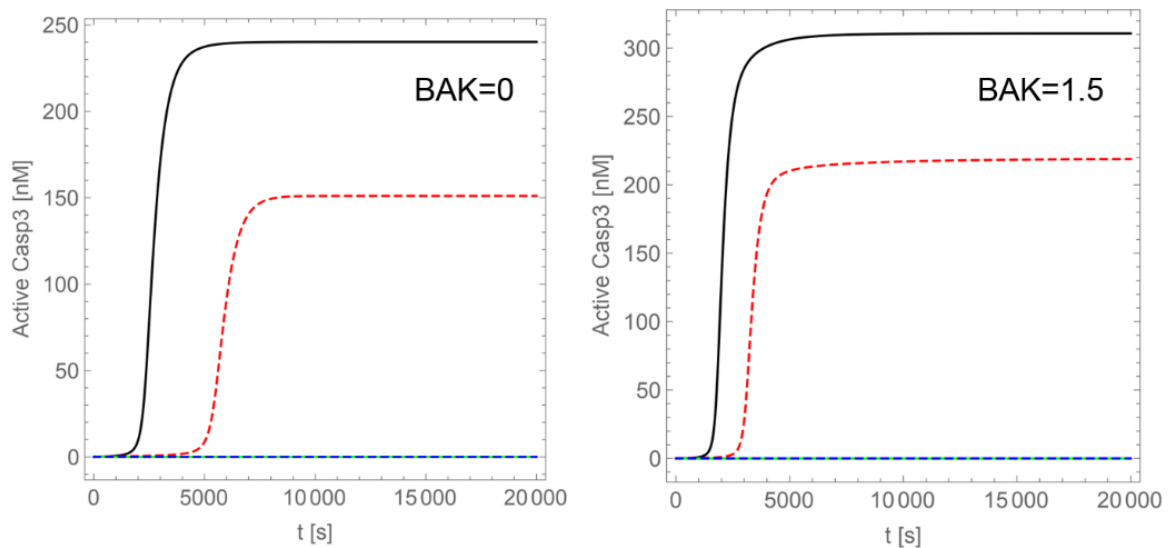


Figura 54: Simulación del curso temporal para el modelo de Apoptosis extendida considerando únicamente el efecto de E2F sobre la síntesis de caspasas y tomando BAK como parámetro. Azul -> E2F= 0; Verde -> E2F=5 nM; Rojo -> E2F= 15 nM; Negro -> E2F=20 nM.

Lo interesante es que si bien en las simulaciones anteriores de los cursos temporales, BAK no logra desencadenar la apoptosis, su presencia sí tiene un efecto sobre la dinámica de activación. Si observamos la Figura 54, vemos que cuando pasamos de BAK=0 a 1.5 nM, la concentración de C3* alcanzada es mayor y el tiempo necesario para que se dispare el aumento de concentración es menor. Sin embargo, BAK no puede hacer que ocurra la activación si esta no ocurre por sí misma sólo con el efecto de E2F. Es decir, BAK afecta la cinética de la activación de la apoptosis, pero no es el factor que define si esta ocurre o no.

Si además analizamos un poco más profundamente los resultados obtenidos en esta simulación para los otros componentes del sistema, podremos entender un poco mejor los mecanismos utilizados tanto por BAK como por E2F para desencadenar la apoptosis.

Fijando BAK en 0 y variando únicamente E2F, vemos que la activación de la apoptosis ocurre por la aparición de C3* y C9* de manera directa. Pero no se observan especies activadoras intermedias como A*, A*C9 y A*C9* como se aprecia en la Figura 55. Es decir que la activación se da por la influencia directa de E2F sobre las tasas de síntesis de las caspasas 3 y 9.

Al añadir BAK=1,5 nM, si bien este no afecta la cantidad de E2F mínima necesaria para la activación, sí permite que esta ocurra más rápidamente y alcance valores mayores de C3*. Si observamos los gráficos para las otras variables, vemos que al añadir BAK aparecen las especies activadoras A*, A*C9 y A*C9*, que parecerían ser las mediadoras del efecto de BAK sobre el sistema (Figura 56).

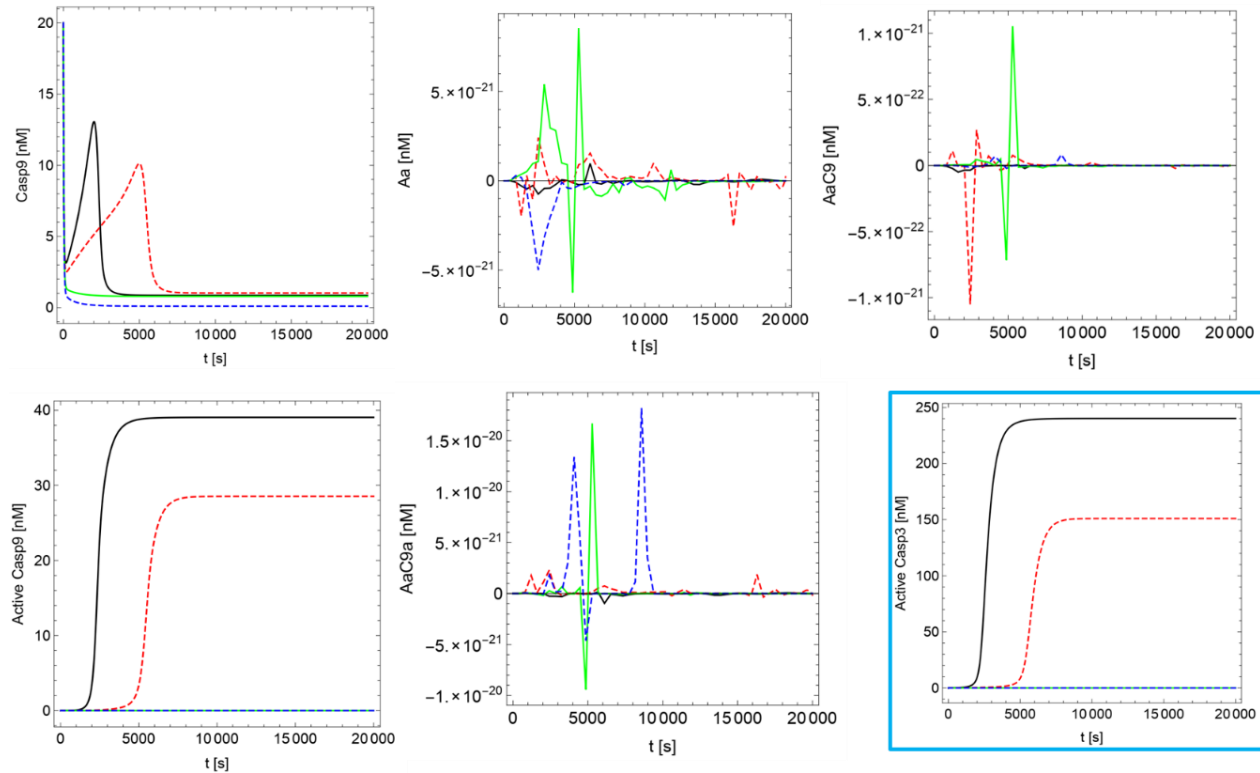


Figura 55: Simulación del curso temporal para el modelo de Apoptosis extendida considerando únicamente el efecto de E2F sobre la síntesis de caspasas y tomando BAK=0. Azul -> E2F= 0; Verde -> E2F=5 nM; Rojo -> E2F= 15 nM; Negro -> E2F=20 nM.

Como conclusión, diríamos que E2F actúa principalmente modulando las tasas de síntesis de las caspasas 3 y 9, mientras BAK estimula la activación vía la formación de A* y los diferentes bucles de retroalimentación en los que participa C9.

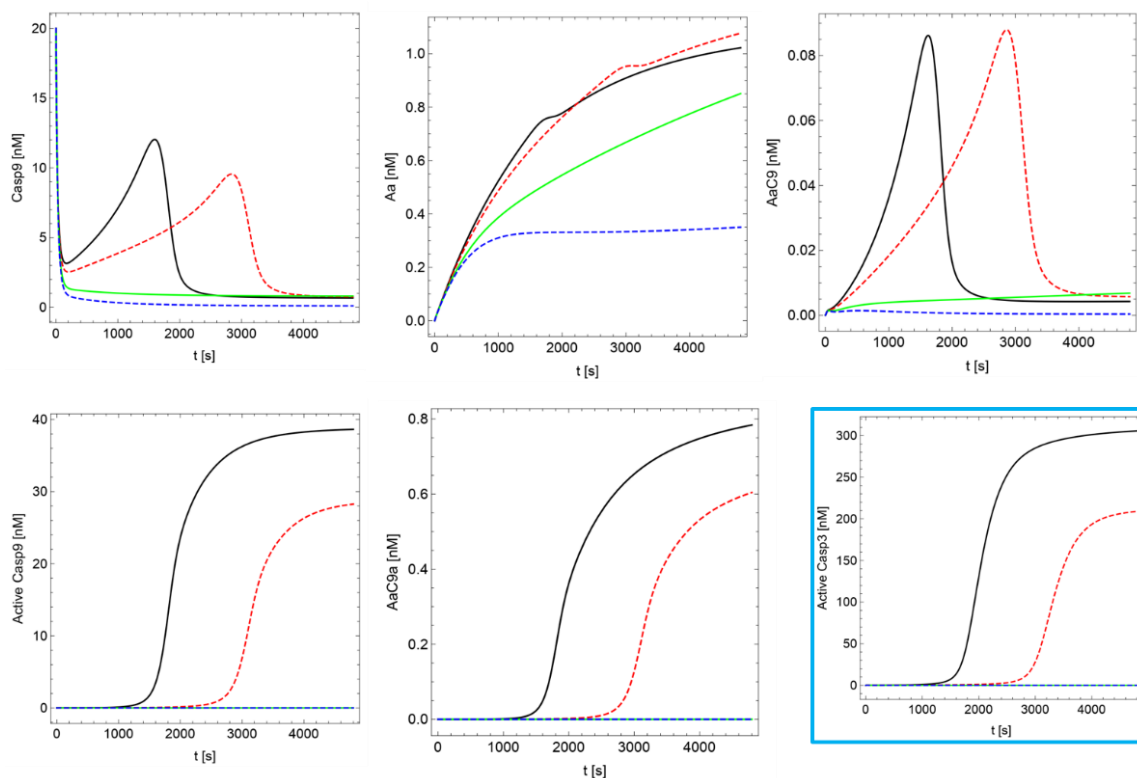


Figura 56: Simulación del curso temporal para el modelo de Apoptosis extendida considerando únicamente el efecto de E2F sobre la síntesis de caspasas y tomando $BAK=1.5$. Azul \rightarrow $E2F=0$; Verde \rightarrow $E2F=5$ nM; Rojo \rightarrow $E2F=15$ nM; Negro \rightarrow $E2F=20$ nM.

3.5.4) Apoptosis extendida-Regulación completa vía E2F

A continuación, se incorporaron los dos efectos de E2F sobre el sistema: la regulación de la síntesis de las moléculas involucradas en la vía intrínseca de la apoptosis (C3, C9 y Apaf-1) y su activación indirecta sobre BAK. En este caso podemos ver que el resultado obtenido es cualitativa y cuantitativamente igual al obtenido cuando se considera solo el efecto sobre las caspasas (Figura 57).

Claramente puede apreciarse en el gráfico de la derecha, como al aumentar la concentración de E2F, utilizada como estímulo, se alcanza un mayor nivel de caspasa 3 activa, mientras se reduce al retardo entre el momento de la aplicación del estímulo y cuando se dispara el aumento en la concentración de C3*. Vemos que la intensidad de la respuesta apoptótica depende de la intensidad del estímulo aplicado. Además, el mecanismo que parece dominar la dinámica de activación en este módulo es la regulación directa sobre la tasa de síntesis de caspasa 3 por E2F.

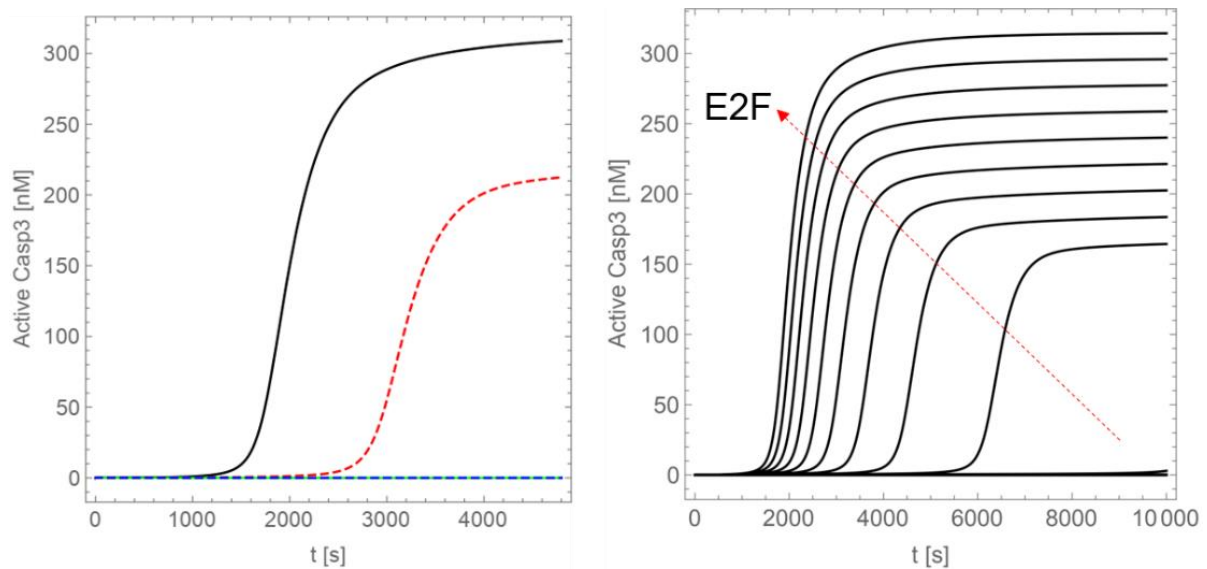


Figura 57: Simulación del curso temporal de activación de C3 variando la intensidad del estímulo utilizado. A la izquierda se muestra el resultado para algunos valores de E2F (Azul -> E2F= 0; Verde -> E2F=5 nM; Rojo -> E2F= 15 nM; Negro -> E2F=20 nM). A la derecha aparece la simulación para concentraciones crecientes de E2F (señalado por la flecha roja) entre 0 y 20 en pasos de 1. Para los tiempos considerados en esta simulación (en función de los tiempos que son relevantes desde el punto de vista biológico), la apoptosis se desencadena para E2F ≥ 12 nM.

3.5.5) Utilización de pulsos de E2F

Para entender mejor la dinámica de la activación cuando se toma la regulación de E2F sobre las tasas de síntesis y sobre BAK al mismo tiempo, se utilizaron pulsos diferentes de E2F.

Pulso escalón

Para utilizar un pulso escalón, simplemente se utiliza una función escalón donde a partir de un tiempo τ , la cantidad de E2F pasa de 0 a un valor máximo que se mantiene durante el resto de la simulación. En otras palabras, E2F tiene el siguiente comportamiento temporal

$$E2F = \begin{cases} 0, & 0 < t < \tau \\ E2F_{max}, & t \geq \tau \end{cases}$$

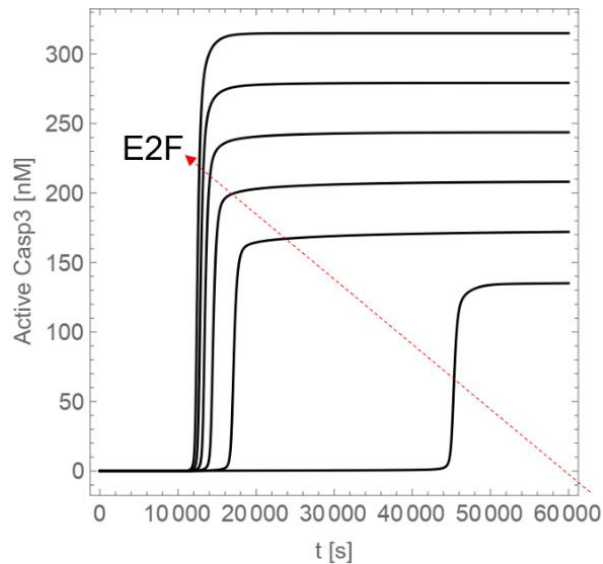


Figura 58: Simulación de curso temporal para la activación de caspasa 3 en el modelo de apoptosis extendida con la regulación completa vía E2F. Se utilizan concentraciones de $E2F_{max}$ crecientes entre 10 y 20 nM, con intervalos de 2. $\tau=3600$ s

Al igual que cuando se fija E2F en una concentración, al utilizar pulsos escalón crecientes de E2F como estímulo, aumenta al valor de concentración de $C3^*$ alcanzado y disminuye el tiempo necesario para que se desencadene la activación. Se observa además que cuando se utiliza $E2F_{max} = 12$ nM, se alcanza un valor máximo de $C3^*$ similar a los que se observan en el modelo de Legewie et al, de alrededor de 140 nM (Figura 58). Pero el tiempo necesario para el que se logre la activación es sensiblemente mayor que el que se requiere para alcanzar la activación para concentraciones de E2F de entre 14 y 20 nM. Además, tal y como se observó anteriormente, cuando se utilizan concentraciones inferiores a 12 nM, los tiempos observados crecen enormemente.

Un aspecto destacable es que más allá de que existen variaciones, las concentraciones de A^{*tot} alcanzadas, oscilan entre 2 y 3 nM (Figura 59). Esto es interesante, ya que en el modelo de Legewie, se utilizan concentraciones de entre 5 y 20 nM de A^{*tot} como estímulo. Daría la impresión de que, en el modelo de apoptosis extendida, cuando se incorpora a E2F, la activación de la apoptosis sería principalmente regulada a nivel transcripcional y no tanto por el apoptosoma. Se debería investigar que tan verosímil es este escenario a nivel celular. Es decir, medir la relevancia relativa de regular por un lado la transcripción y por otro lado la formación del apoptosoma sobre la activación de la apoptosis.

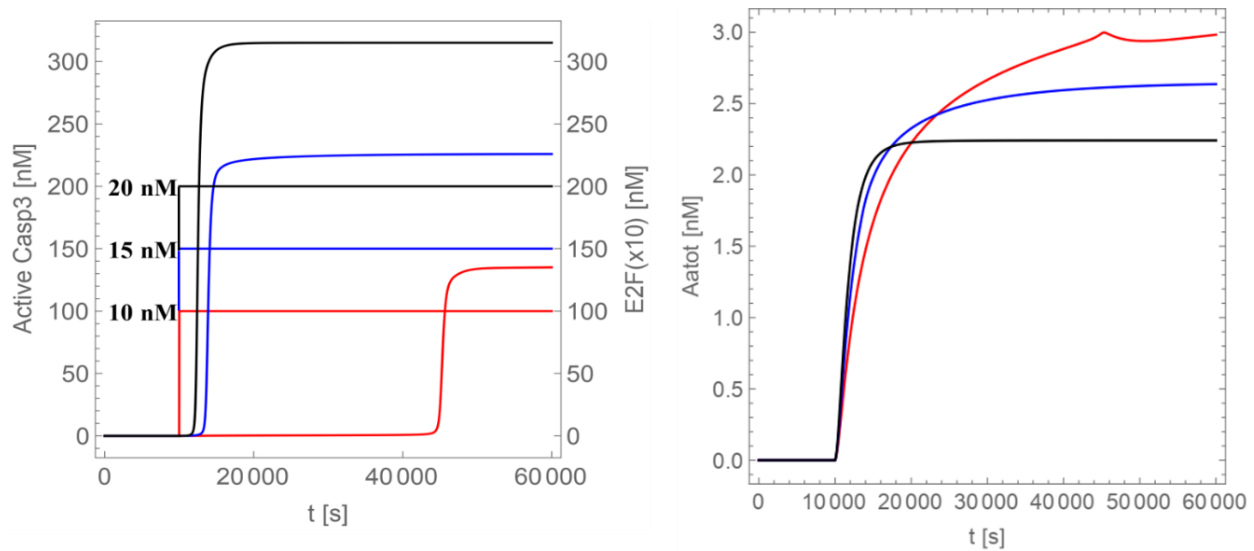


Figura 59: Simulación de curso temporal para el modelo de apoptosis extendida incluyendo la regulación completa vía E2F. Se observan curvas de distintos colores para los diferentes valores de $E2F_{max}$ utilizados, Rojo $\rightarrow E2F= 10 \text{ nM}$; Azul $\rightarrow E2F= 15 \text{ nM}$; Negro $\rightarrow E2F=20 \text{ nM}$. A la izquierda se muestra el gráfico de variación temporal de $C3^*$ y a la derecha como varía la cantidad de A^{*tot} . $\tau=3600 \text{ s}$

Pulso rectangular

Para entender mejor el efecto de la duración de los estímulos, utilizamos un pulso rectangular. Este pulso es similar a un pulso escalón, con la diferencia de que la función se mantiene en el valor máximo por un periodo de tiempo limitado. Entonces, el comportamiento temporal de E2F puede resumirse de la siguiente manera:

$$E2F = \begin{cases} 0, & 0 < t < \tau_1 \\ E2F_{max}, & \tau_1 \leq t < \tau_2 \\ 0, & \tau_2 \leq t \end{cases}$$

En este caso, variamos tanto la intensidad como la duración del estímulo. Cuando se mantiene la duración constante y se varía la intensidad del estímulo obtenemos resultados similares a cuando se utiliza el pulso escalón. A mayor intensidad del estímulo, la activación ocurre más rápidamente y se alcanzan niveles mayores de caspasa 3 activa (Figura 60)

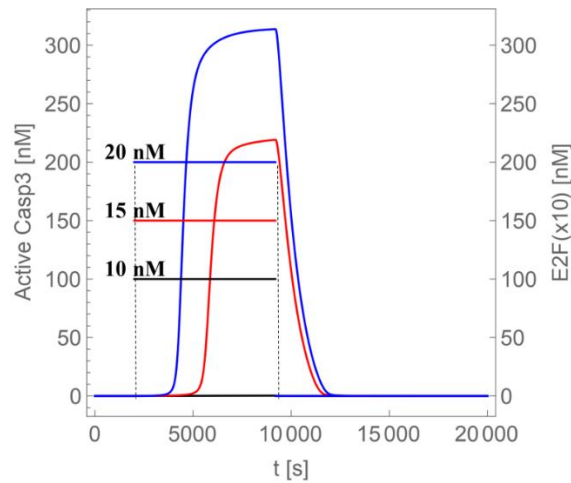


Figura 60: Simulación de curso temporal utilizando estímulos de una duración de 7200 s (2 horas) y diferente intensidad.

En cambio, al utilizar un pulso rectangular de intensidad constante $E2F=20$ nM y variar la duración del pulso, no cambia ni el tiempo de activación ni el nivel de $C3^*$ alcanzado. Sin embargo, cuanto más largo sea el estímulo, la caspasa 3 se mantiene activa por más tiempo (Figura 61).

Ambas simulaciones tienen en común que, independientemente de la intensidad y la duración del estímulo, la cantidad de caspasa 3 activa cae abruptamente a 0 cuando el estímulo desaparece.

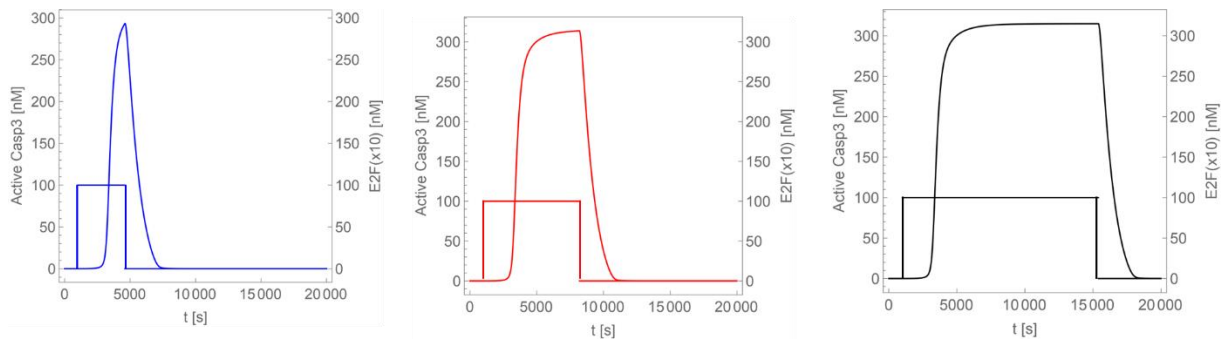


Figura 61: Simulación de cursos temporales utilizando pulsos rectangulares de E2F de diferente duración. Rojo -> $dt=3600$ s (1 hs); Azul -> $dt=7200$ s (2 hs); Negro -> $dt=10800$ s (3 hs)

Que la caspasa activa desaparezca al quitarse el estímulo es coherente con lo observado en los diagramas de bifurcación. En todos los casos, si se incorpora el efecto de E2F sobre la síntesis de caspasas (se tome su efecto sobre BAK o no), la apoptosis pasa a ser reversible. En otras palabras, cuando $E2F=0$, existe un único estado estacionario posible, en el cual $C3^* \approx 0$. Sin embargo, en un contexto de la fisiología celular más amplio que el que abarca el modelo que estamos estudiando, que desaparezcan las caspasas activas después de cierto tiempo no implica necesariamente que la célula vaya a sobrevivir. Es probable que si la vía intrínseca de la apoptosis está activa por suficiente tiempo, cause daños que sean prácticamente irreversibles. A su vez, aunque las caspasas estén activas mucho tiempo, que la célula pueda sobrevivir, dependerá de qué otros procesos están activos.

Seguidamente, se calculó la relación entre el retardo observado en la activación y la intensidad del estímulo utilizado. Se definió el retardo o lag del sistema como el tiempo necesario para llegar al 90% de la concentración máxima de $C3^*$ alcanzada por el sistema. Puede verse claramente en la Figura 62 que el lag disminuye al aumentar la intensidad del estímulo, pero no lo hace indefinidamente. Aparentemente, existe un tiempo mínimo requerido por el sistema para activarse, alrededor de 4000 s (1.4 hs aproximadamente). Este límite, puede indicar que se necesita un cierto tiempo para que se genere las moléculas necesarias para generar la activación de la apoptosis. Es decir, como es esperable, existen restricciones físicas a la velocidad del proceso. Además, como se había observado anteriormente, cuando se utilizan concentraciones de E2F inferiores a 12 nM, el tiempo necesario para la activación aumenta enormemente. A su vez, detectamos que para concentraciones de E2F inferiores a 9.5 nM, no se observa activación en ningún momento. Este valor de E2F coincide con el punto de bifurcación en el diagrama de estados estacionarios (Figura 46). A partir de este, el sistema pasa de una región biestable, a tener un único estado estacionario de alta concentración de $C3^*$.

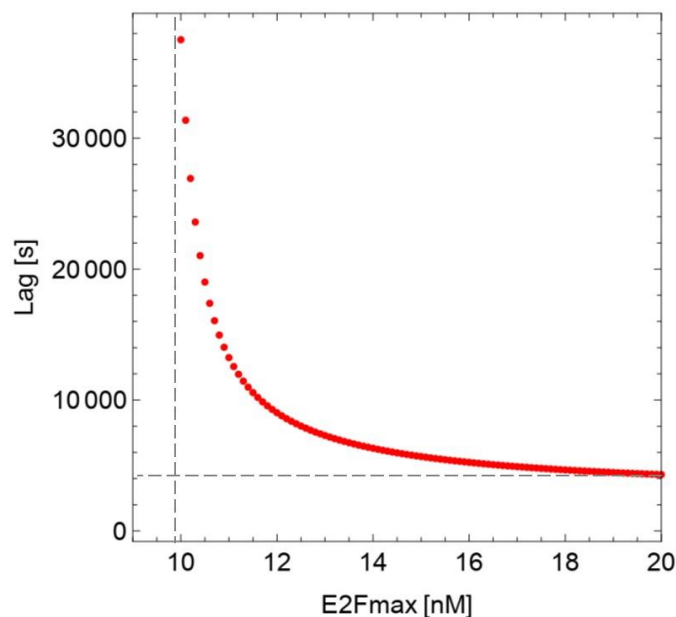


Figura 62: Gráfico del retardo (Lag), expresado en segundos (s), observado en la activación de la capasa 3 en función de la concentración de E2F máxima que se le aplica al sistema como estímulo. El retardo tiende a un valor mínimo a medida que el estímulo apoptótico aumenta. Además, cuando se utilizan concentraciones de E2F inferiores a 12 nM, el lag crece enormemente

Finalmente se determinó la duración mínima de un estímulo para que el sistema logre desencadenar la apoptosis. Para ello se calcula en cada caso la concentración de $C3^*$ más alta alcanzada en función de la duración del estímulo aplicado, para una concentración determinada de E2F. Puede verse que cuanto mayor es la intensidad del estímulo, menor es el tiempo que se requiere para alcanzar la máxima concentración de $C3^*$ (mesetas de las curvas sigmoides en la Figura 63). Es decir que aumentar la concentración de E2F utilizada, no solo aumenta el valor máximo de $C3^*$ posible, sino que también reduce el tiempo necesario para alcanzarlo.

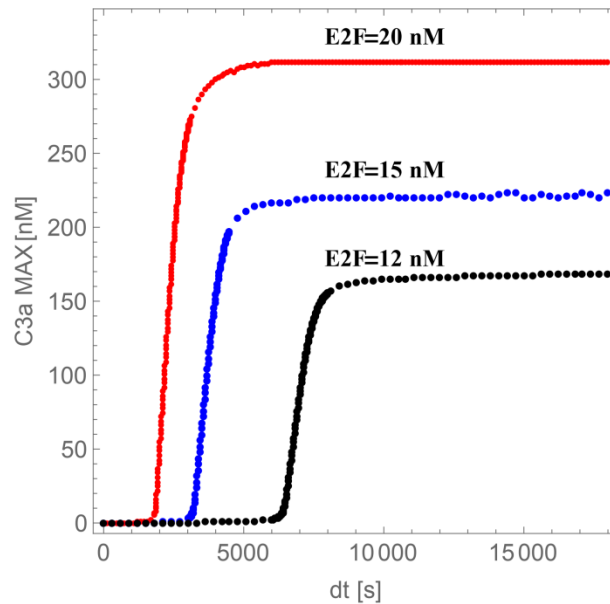


Figura 63: Valor máximo de $C3^*$ vs tiempo que actúa el estímulo (para diferentes valores de $E2F$). Se aprecia que cuanto mayor es $E2F$, menor es el tiempo para llegar a una concentración de $C3^*$ dada. Por ejemplo, si $E2F=12$ nM, para que la concentración de $C3^*$ llegue a 150 nM, se requiere un estímulo de alrededor de 10000 s (cerca de tres horas), mientras que cuando $E2F=20$ nM, se requieren unos 2000 s (un poco más de media hora).

3.6) Estudio del módulo mínimo de activación de caspasa 3

En base a los resultados obtenidos hasta el momento, para intentar entender mejor el papel de cada uno de los componentes que regulan la activación de la apoptosis, decidimos reducir el modelo. Para ello eliminamos toda la influencia de moléculas activadoras, excepto la de $E2F$ sobre la tasa de síntesis de caspasa 3 (ver Figura 64).

Se conservan las leyes de velocidad v_{15} , v_{18} , v_{22} , v_{23} y v_{24} , y la velocidad v_G colapsa los diferentes mecanismos de activación de la caspasa 3 en una sola velocidad.

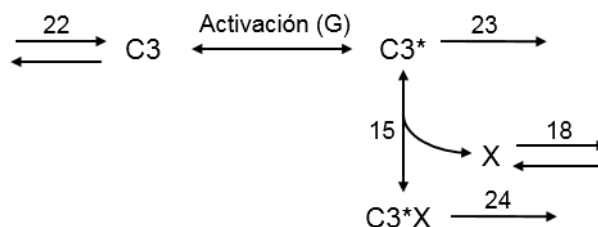


Figura 64: Core de activación de caspasa 3. La reacción de activación (G) resume en un solo paso las formas que tiene de activarse $C3$, permitiendo eliminar los diferentes feedbacks positivos asociados a la presencia de $C9$ y A^*

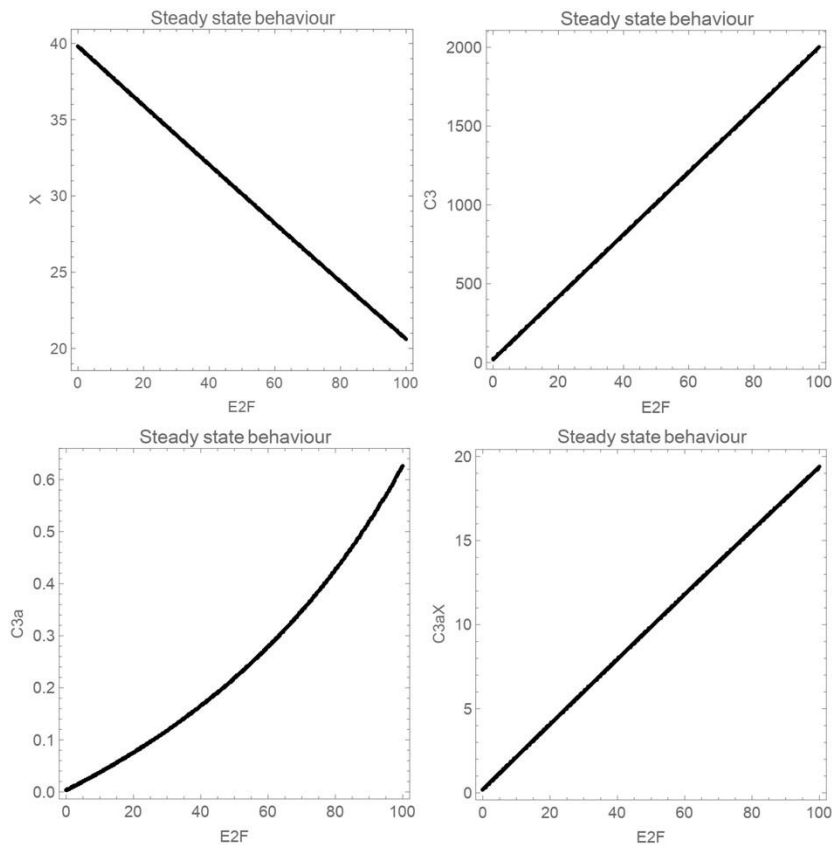


Figura 65: Diagrama de bifurcación en función de E2F para las cuatro variables del core de activación de caspasa 3. Podemos observar que el sistema es monoestable para todos los valores de E2F considerados.

Al realizar el estudio de los estados estacionarios del sistema, obtenemos que para valores de E2F entre 0 y 100 nM, o sea para valores bajos, moderados y altos, el sistema es monoestable (Figura 65). Es decir, en todos los casos existe un único estado estacionario posible en el cual la apoptosis no se activa. Podemos deducir esto rápidamente al ver que incluso para estímulos muy intensos, la concentración de caspasa activa alcanzada no llega a 1 nM. Se verificó la estabilidad de los estados estacionarios a través de las simulaciones temporales (Figura 66).

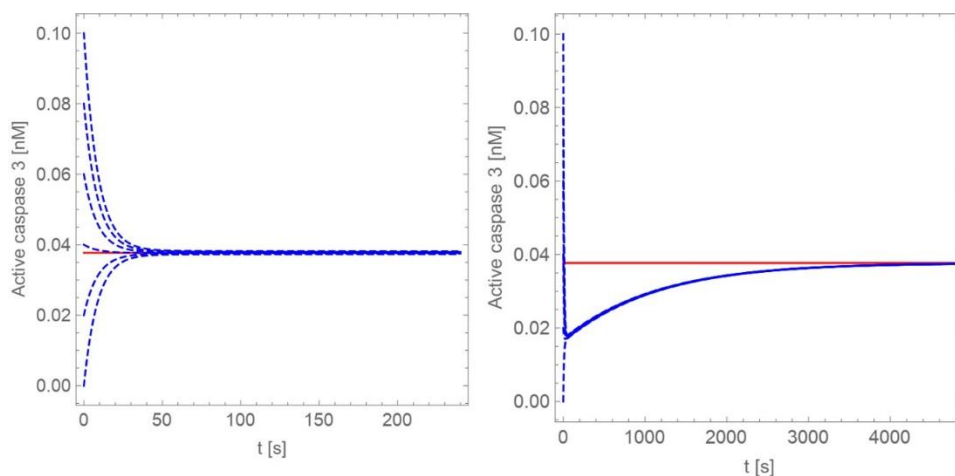


Figura 66: Simulación temporal para la aparición de caspasa 3 activa. A la izquierda se puede ver la evolución temporal cuando todas las variables excepto C3*inicial están en su valor estacionario y a la derecha el resultando cuando ninguna de las variables está en su valor estacionario al iniciar la

simulación. En rojo se marca el estado estacionario y en azul las trayectorias obtenidas a partir de la perturbación del mismo. Estado estacionario mostrado: $E2F=10nM$; $X=37.859 nM$; $C3=217,82 nM$; $C3^=0.03769 nM$, $C3^*X= 2.1405 nM$*

Podemos concluir, que si bien existe una activación directa de E2F sobre la síntesis de caspasa 3, este efecto por sí sólo no puede superar la inhibición por XIAP. Si recordamos los resultados de la sección 3.5.3, veíamos que el principal efecto de E2F para activar la apoptosis era a través de las tasas de síntesis de las caspasas 3 y 9, sin que se generaran especies activadoras como A^* , A^*C9 , A^*C9^* . Pero sí se observaba una importante producción de caspasa 9 activa ($C9^*$). Estos resultados, combinados con lo obtenido al analizar este core de C3, nos indica que aunque el principal regulador de este modelo es el efecto de E2F sobre las tasas de síntesis, la amplificación vía C9 sí es necesaria. Esto podemos concluirlo porque en este caso se utiliza una regulación igual sobre la tasa de síntesis, pero no se observa la regulación tipo switch en la activación encontrada anteriormente. En resumen, aunque sí es cierto que el efecto de regulación más fuerte es vía la tasa de síntesis de C3, la amplificación a través de la caspasa 9 parece tener un rol importante. En principio, parece ser que la producción de $C9^*$ es necesaria para superar la inhibición por XIAP de la vía intrínseca de la apoptosis.

4) Conclusiones

En nuestro trabajo, utilizamos metodologías matemáticas y computacionales para estudiar diferentes modelos matemáticos de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Los objetivos fueron intentar entender mejor los mecanismos de activación y caracterizar el punto de no retorno.

Consideramos, principalmente, tres modelos. Por una parte, estudiamos el Modelo de Apoptosis de Legewie et al. [71], en aspectos que no fueron reportados en la bibliografía. Además, se estudió el modelo de Legewie et al. acoplado a un Módulo de Activación de la apoptosis (creado en el transcurso de este trabajo). Este incorpora aspectos básicos de la cadena respiratoria, la demanda metabólica, la permeabilización mitocondrial y la formación del apoptosoma, al que denominamos, Modelo de Apoptosis Extendida. Finalmente, incorporamos el Modelo de Glicólisis Reducida de Mulukutla et al. [77] al modelo de Apoptosis extendida, obteniendo el Modelo Integrado de Apoptosis con el metabolismo. Este último, además, toma en cuenta el consumo de ATP por la activación de la caspasa 9.

Al analizar los estados estacionarios del Modelo de Apoptosis Extendida, obtuvimos que se mantiene cualitativamente el comportamiento observado en el Modelo de Apoptosis de Legewie et al. Es decir, la apoptosis es biestable (presentando dos estados estables y uno inestable) e irreversible. Si observamos el comportamiento energético del modelo, vemos cierta disrupción de la cadena respiratoria, pero la misma no es total y además los niveles de ATP presentan una caída moderada (gráficas no mostrada). Estos resultados son consistentes con los obtenidos estudiando

el Módulo de Activación aisladamente, el cual presentó un comportamiento monoestable y lineal.

El Modelo Integrado de Apoptosis, que incluye la glicólisis, puede presentar hasta nueve estados estacionarios. Sin embargo, al analizar los diferentes estados obtenidos, se constató que las variables pueden tener como máximo tres valores posibles. Esto indica, que los estados obtenidos corresponden a la combinación de los estados estacionarios de la glicólisis con los estados estacionarios de la apoptosis. Si bien hay conexiones entre la apoptosis y la glicólisis vía el componente energético, los módulos operan de manera relativamente independiente. En este trabajo no exploramos exhaustivamente la interacción de la apoptosis y el metabolismo, por lo que sería muy interesante profundizar el análisis en proyectos futuros.

Después de caracterizar los estados de los diferentes modelos utilizados en el trabajo, seguimos en la línea de estudiar de manera sistemática el punto de no retorno en la apoptosis. Para ello realizamos un análisis exhaustivo de los parámetros del Modelo de Legewie et al. y el Modelo de apoptosis extendida. Realizamos diagramas de bifurcación en estímulo 0 ($A^*_{tot}=0$ o $BAK=0$, según corresponda) para cada uno de los parámetros multiplicando y dividiendo por diez el valor de referencia. Obtuvimos que, de los 61 parámetros estudiados, un conjunto de 15 parámetros, todos ellos en el módulo de apoptosis, tienen un efecto significativo sobre el comportamiento del sistema. Modificando algunos de los parámetros puede lograrse que la apoptosis sea bistable, reversible o irreversible. En particular, encontramos que la mayor sensibilidad del sistema se encuentra en las tasas de síntesis de las caspasas 3 y 9, y XIAP (k_{22r} , k_{17r} y k_{18r} , respectivamente). Para estos tres parámetros, cambios moderados en sus valores permiten que la apoptosis sea reversible o irreversible. Parece razonable que exista una fuerte sensibilidad del sistema a las tasas de síntesis de sus componentes, ya que a nivel último, la cantidad de proteínas activadoras es lo que determina los niveles de activación que puede alcanzar el sistema. Al incorporar esta información en cursos temporales, obtuvimos que modificar los parámetros durante la simulación, efectivamente afecta la evolución temporal del sistema. En particular, seis de los quince parámetros identificados inicialmente (k_{17r} , k_{18r} , k_{22} , k_{22r} , k_{23} , k_{26}) le permiten al sistema revertir la activación de la apoptosis. Es decir, si durante la simulación se modifica adecuadamente el parámetro correspondiente, se pasa de un estado inicial de alto valor de $C3^*$ valores de $C3^*$ cercanos a 0. O sea, la activación de la apoptosis se revierte. Cabe destacar, que estos seis parámetros se corresponden con las tasas de síntesis y degradación de los principales componentes de la apoptosis, siendo k_{17r} , k_{18r} y k_{22r} tasas de síntesis y k_{22} , k_{23} y k_{23} tasas de degradación. Sin embargo, nuevamente el mayor efecto se ve a nivel en las tasas de síntesis de las caspasa 3 y 9, y de XIAP. Estos resultados, implicarían que la célula es capaz de revertir la apoptosis modificando adecuadamente cualquiera de los parámetros mencionados, es decir tasas de síntesis y degradación de sus componentes.

En base a estos resultados, se investigó en la bibliografía la regulación transcripcional de la apoptosis. Se encontró que el factor de transcripción E2F, regula de forma directa

la tasa de síntesis de las moléculas C3, C9 y Apaf-1, y tiene un efecto indirecto en la activación de la apoptosis a través de BAK.

Al incorporar al modelo el efecto que E2F tiene en las constantes que representan las tasas de síntesis, obtuvimos el mayor efecto sobre la tasa de síntesis de caspasa 3. De hecho, cuando se regulan las tres tasas a la vez, el efecto sobre los estados estacionarios es cualitativamente igual y cuantitativamente muy similar al resultado que se obtiene regulando únicamente la tasa de síntesis de C3. Estos comportamientos no cambian significativamente si, además, se incluye el efecto indirecto de E2F a través de BAK. Estos resultados son muy razonables. Primero porque encontramos que existe un elemento regulador de la expresión en la célula (E2F) que actúa sobre dos de los tres parámetros con mayor sensibilidad del sistema según nuestro estudio. Además, cuando se incorpora E2F al modelo, efectivamente el mayor efecto es a nivel de la síntesis de caspasa 3. Esto es interesante, porque más allá de todas las capas de regulación del sistema, al menos en este modelo, la regulación más fuerte ocurre a nivel de la principal molécula ejecutora de la apoptosis. Con respecto al efecto que tiene la variación de E2F en las concentraciones estacionarias de $C3^*$, encontramos que según el valor de E2F sea bajo, alto o intermedio, la apoptosis no ocurre, ocurre necesariamente o presenta un umbral de activación regido por un comportamiento biestable, respectivamente.

A continuación, realizamos las simulaciones temporales de la activación de la apoptosis para los diferentes modelos considerados. Al realizar los cursos temporales del Modelo de Apoptosis Extendida se obtuvieron resultados llamativos.

Primeramente, cuando analizamos el modelo utilizando BAK como el único parámetro de activación, el sistema no puede llegar al estado de activación partiendo de valores bajos de $C3^*$, es decir en lo que serían condiciones celulares normales. Esto en principio es contradictorio con lo observado en los diagramas de bifurcación, donde para todos los valores de BAK representados hay biestabilidad (Fig 25c). Sin embargo, alcanzar el estado estacionario alto de $C3^*$ también requiere la formación de otras moléculas activadoras intermedias, como $C9^*$, A^*C9 , A^*C9^* . Si revisamos la evolución temporal de las moléculas activadoras derivadas de C9 y A^* , vemos que, si bien se consume C9, no se generan moléculas activadoras. Es decir que el potencial del sistema para activarse parece “disiparse” antes de que se desencadene la activación de la caspasa 3. Por otro lado, tenemos que si modificamos las concentraciones iniciales de $C9^*$, A^*C9 y A^*C9^* , manteniendo la concentración total de moléculas derivadas de C9 constantes, logramos que ocurra la activación durante la simulación de manera irreversible, tal y como indican los diagramas de bifurcación. Entonces, la aparente contradicción inicial simplemente es un indicador de la importancia de que se generen las moléculas activadoras en un periodo de tiempo adecuado. Podemos concluir que sin otro mecanismo que potencie la producción de moléculas intermedias, el estímulo por BAK es insuficiente para generar la activación de la apoptosis. Una explicación a este resultado es que en este modelo no se toman en cuenta las numerosas interacciones entre proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 y otros reguladores celulares que retroalimentan la actividad del apoptosoma, los que

actuando junto con BAK, podrían permitir la activación partiendo de valores bajos de C3*. Por otro lado, la degradación de C9 previo a la aparición de A* podría explicarse argumentando que deben darse varios procesos entre la aparición de la señal y que efectivamente se forme el apoptosoma (por ejemplo, la liberación del citocromo C al citosol), lo que retrasa la activación. Entonces, podemos decir que estaría haciendo falta un mecanismo auxiliar que le permita al sistema alcanzar el estado de activación de la apoptosis en un marco temporal adecuado, antes de que se degrade la caspasa 9.

En base a estos últimos resultados, incorporamos el efecto del factor de transcripción E2F en las simulaciones temporales. Se estudió la evolución del modelo considerando la influencia de E2F por un lado sobre la síntesis de caspasas y Apaf-1, y por otro lado, sobre BAK y finalmente considerando los dos efectos de E2F a la vez.

Empezamos por la influencia de E2F sobre la síntesis de caspasas, manteniendo a BAK como parámetro. En este caso, obtenemos que a partir de cierto umbral de E2F, se da la activación de la apoptosis. Cuando se utilizan diferentes concentraciones fijas de BAK, vemos que la presencia de este no cambia el umbral de activación, pero sí permite que se desencadene más rápidamente y se alcancen concentraciones mayores de C3*. Por otro lado, vemos que en ausencia de BAK, aunque se generan enormes cantidades de C3* y C9*, no se generan especies intermediarias, como A*, A*C9*, etc. De todo esto, se concluye que lo que domina la activación del sistema es el efecto de E2F sobre las tasas de síntesis. BAK actúa como un modulador del tiempo y la intensidad de la activación, pero no define si esta ocurrirá o no.

Pasando a la influencia de E2F sobre BAK (sin considerar su efecto sobre las tasas de síntesis), vemos que se repite el escenario de si se considera a BAK como el único parámetro. Es decir, en principio no se observa activación de la apoptosis, pero modificando adecuadamente las condiciones iniciales, se obtiene la activación irreversible predicha por los diagramas de bifurcación. En otras palabras, el efecto de E2F sobre BAK por sí mismo no es capaz de activar la apoptosis antes de que se degrade la caspasa 9.

En suma, si consideramos los dos efectos de E2F en el sistema, obtenemos un comportamiento cualitativo y cuantitativo muy similar a cuando sólo se considera su efecto sobre las tasas de síntesis. En base a esto y los resultados anteriores concluimos que el efecto principal de E2F sobre el sistema es sobre las tasas de síntesis y la activación vía BAK es un mecanismo modulador del tiempo e intensidad de la respuesta. A su vez, vemos que principalmente el efecto de BAK ocurre vía la producción de las moléculas activadoras derivadas de C9 (C9*, A*C9, A*C9*)

Frente a estos resultados, se decidió analizar un núcleo mínimo de activación de caspasa 3 que eliminara todo el efecto mediado por C9 y A* y mantuviera la modulación de la tasa de síntesis de C3 por E2F. Como resultado, se tuvo que el sistema presenta una activación con un único estado estacionario estable. A su vez, vemos que no se alcanzan concentraciones de C3* compatibles con la activación de la apoptosis. Recordando la sección 3.5.3, la activación de la apoptosis vía E2F ocurre

por la producción directa de caspasas y aparición de C3* y C9*. Estos resultados combinados, nos permiten concluir que más allá de que el principal efecto ocurre sobre la tasa de síntesis de caspasa 3, el efecto sobre la caspasa 9 también es necesario para que ocurra la activación. En particular, parece que C9* es requerido para superar la inhibición por XIAP sobre C3*.

Finalmente, surge la pregunta de por qué existen tantos niveles de regulación cuando existe una manera directa de controlar los niveles de los diferentes componentes del sistema. Parece razonable suponer entonces que los diferentes mecanismos de activación y retroalimentación permiten modular las respuestas del sistema, de manera que la apoptosis ocurra sólo cuando debe y pueda revertirse cuando sea necesario.

5) Perspectivas

Como perspectiva para trabajos futuros, sería muy interesante estudiar la relevancia de estos mecanismos a nivel de las células a nivel experimental. Es decir, ver de alguna manera si las predicciones del modelo sobre cuál es el mecanismo de acción de los determinados factores se ajusta a la realidad. Por ejemplo, determinar si efectivamente E2F actúa preferentemente sobre la síntesis de caspasa o cuál de las moléculas activadoras derivadas de C9 tiene un rol más importante. Para ello podría impedirse la unión de E2F a su secuencia blanco en los genes de las caspasas y ver si esto realmente tiene un efecto sobre la activación de la apoptosis. También podrían realizarse ensayos activando o inhibiendo selectivamente cada una de las especies derivadas de C9, como C9*, A*C9 o A*C9* y ver cuál de ellas tiene un mayor efecto sobre los niveles de producción de caspasa 3 activa.

Además, el modelo sería útil para predecir el efecto de bloquear o sobre expresar ciertas moléculas sobre las concentraciones de caspasa activa alcanzadas, es decir, sobre la activación de la apoptosis.

Un aspecto interesante que no llegamos a abordar en la tesis de manera amplia es el efecto del estado energético celular sobre la activación de la apoptosis. En particular, estudiar de manera tanto experimental como teórica si es posible revertir la disrupción de la cadena respiratoria que ocurre al activarse la apoptosis. Además, sería importante estudiar si efectivamente la compensación de la producción de ATP por flujo de la glicólisis es capaz de explicar que las células sobrevivan luego de la pérdida de la función mitocondrial o tal vez deban considerarse otros factores.

También es claro que si se desea entender en mayor profundidad los mecanismos de regulación que operan en la regulación de la apoptosis, es necesario incluir más interacciones upstream de las proteínas reguladoras de la familia Bcl-2. Esto es indispensable si se desea modelar la complejidad y variabilidad en las señales que pueden dar lugar a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis.

Sería importante en algún momento integrar el rol señalizador de E2F sobre la apoptosis con su papel como factor de transcripción en la progresión del ciclo celular.

Debería poder generarse un modelo que explique como estas funciones aparentemente contradictorias pueden nuclearse en una misma molécula. En principio, sin ahondar demasiado en los mecanismos, aparecen dos grandes posibilidades. La primera es que la función que cumple E2F dependa del contexto, es decir que se una a genes que promueven la proliferación ó la apoptosis dependiendo de qué otras moléculas están presentes en ese momento. La otra posibilidad es más sutil, e implicaría que E2F señalice la apoptosis o la progresión del ciclo celular dependiendo de su rango de concentración. En este caso debería entenderse como diferentes concentraciones, favorecen que E2F se una a un tipo de gen o a otro. Finalmente cabe la posibilidad de que sea una combinación de estos mecanismos los que permiten este comportamiento dual de E2F.

Por otro lado, existe una estricta regulación espacial de todos estos procesos, sin ir muy lejos, la compartimentalización a nivel de la mitocondria es una fuerte regulación de la apoptosis. Considerar incorporar los gradientes espaciales podría ser importante, pero debería determinarse qué tanto contribuiría al entendimiento del sistema, en relación con la complejidad que agregaría al modelo.

Finalmente, dada la información experimental reciente, tal vez la formación de caspasa 3 activa no sea en todas las situaciones la mejor elección como medida de la activación de la apoptosis. En nuestro modelo, si la cantidad de C3* activa supera cierto umbral, se considera que la célula morirá por apoptosis. Sin embargo, en la práctica la muerte puede revertirse en etapas muy posteriores a la activación de las caspasas. En otras palabras, para analizar cabalmente la reversibilidad de la apoptosis o estudiar procesos celulares más complejos como la anastasis, habría que considerar el tiempo que lleva a la célula efectivamente desmantelarse y cuáles de estos procesos pueden revertirse.

6) Bibliografía

[1] Elmore. S: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicologic Pathology 2007, Vol 35, pp 495-516

[2] Edinger. A. E, Thompson. C. B: Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy Current Opinion in Cell Biology 2004, Vol 16, pp 663-669.

[3] Gong. Y, Crawford. J. C, Heckmann. B. L, Green. D. R: To the Edge of cell death and back. The FEBS Journal 2019. Vol 283, pp 430-440.

[4] Ren. Y, Savill. J: Apoptosis: The importance of being eaten. Cell Death and Differentiation 1998, Vol 5, pp 563-568

[5] Wyllie. A. H: "Where, O Death, Is Thy Sting?" A Brief Review of Apoptosis Biology. Molecular Neurobiology 2010, Vol 42, pp 4-9.

[6] Green. D. R, Amarante-Mendes. G: The Point of No Return: Mitochondria, Caspases and the Commitment to Cell Death. From Apoptosis: Mechanisms and Role in Disease. Kumar. S (editor). Springer 1998. Chapter 1, pp 45-61.

[7] <http://www.abnova.com/support/resources.asp?switchfunctionid={CBB86AB6-2EA6-422F-BBBD-1CB8B9DCE6FA}>

- [8] Galluzzi. L, Vitale. I: Molecular mechanisms of cell death: recommendation of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation* 2018, Vol 25, 486-541.
- [9] Wajant. H: The Fas signaling pathway: More Than Paradigm. *Science* 2002, Vol 296: Issue 5573.
- [10] Guicciardi. M. E, Gores. G. J: The Death Receptor Pathway; from *Essentials of Apoptosis. A Guide for Basic and Clinical Research*. Yin. X. M, Dong. Z (editors). 2da edición. Human Press, Springer Science + Business Media 2009. Chapter 5, pp 119-150.
- [11] Schleich. K, Larvi. I. N: Systems Biology of Death Receptor Induced Apoptosis; from *Systems Biology of Apoptosis*. Larvik. I. N. Springer Science + Business Media 2013. Chapter 2, pp 36-56
- [12] Schleich. K, Larvi. I. N: Systems Biology of Death Receptor Induced Apoptosis; from *Systems Biology of Apoptosis*. Larvik. I. N. Springer Science + Business Media 2013. Chapter 2, pp 36-56
- [13] Jiang. X, Wang. X: Cytochrome C-Mediated Apoptosis. *Annual Reviews of Biochemistry* 2004, Vol 73: pp 87-106
- [14] Kroemer. G: Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, Vol 304, pp 433–435.
- [15] Gogvadze. V, Orrenius. S, Zhivotovsky. B: Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondrial in apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006, Vol 1757, pp 639–647
- [16] Riedl. S, Salcesen. G. S: The apoptosoma: signalling platform of cell death. *Nature reviews/Molecular Cell Biology* 2007, Vol 5, pp 405-413.
- [17] Jiang. X, Wang. X: Cytochrome C Promotes Caspase-9 Activation by Inducing Nucleotide Binding to Apaf-1. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, Vol 275, Num 40, 31199-31203.
- [18] Hu. Y, Benedict. M. A, Ding, L, Núñez. G: Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1 mediated caspase-9 activation and apoptosis. *The EMBO Journal* 1999, Vol 18, Num 13, pp 3586-3595.
- [19] Eckelman. B. P, Salvensen. G. S, Scott. F. L: Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO reports* 2006, Vol 7, Num 10, pp 988-994.
- [20] Tait. S. W. G, Green. D. R: Mitochondrial Regulation of Cell Death. From Additional Perspectives on Cell Survival and Cell Death. Baehrecke. E. H, Green. D. R, Kornbluth, Salvesen. G. S (editors). Cold Spring Harbor Laboratory Press 2013.
- [21] Smyth. M. J, Trapani. J. A: Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunology Today* 1995, Vol 16, Num 4, pp 202-206.
- [22] Shi. L, Mai. S, Israels. S, Browne. K, Trapani. J. A, Greenberg. A.H: Granzyme B (GraB) Autonomously Crosses the Cell Membrane and Perforin Initiates Apoptosis and GraB Nuclear Localization. *Journal of experimental Medicine* 1997, Vol 185, Num 5, pp 855-866.
- [23] Frisch S. M, Sreaton. R. A: Anoikis mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology* 2001. Vol 13, pp 555-562.
- [24] Magi. S, Iwamoto. K, Okada-Hatakeyama. M: Current status of mathematical modeling of cancer – From the viewpoint of cancer hallmarks. *Current Opinion in Systems Biology* 2017, Vol 2, pp 38-47
- [25] Porter. A. G, Jänicke. R. U: Emerging roles of caspase -3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 1999, Vol 6, Num 99, pp 99-104.
- [26] Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. Kitazumi. I, Tsukahara. M. *The FEBS Journal* 2011, Vol 278, pp 427-441.

- [27] Ding. W-X, Yin. X-M: The Bcl-2 Family Proteins.; from *Essentials of Apoptosis. A Guide for Basic and Clinical Research*. Yin. X-M, Dong. Z (editors). 2da edición. Human Press, Springer Science + Business Media 2009. Chapter 2, pp 25-61
- [28] Scorrano L, Korsmeyer. S. J: Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol 304, pp 437–444.
- [29] Chen. C, Cui. J, Lu. H, Wang. R, Zhang. S, Shen. P: Modeling of the Role of a Bax-Activation Switch in the Mitochondrial Apoptosis Decision. *Biophysical Journal* 2007, Vol 92, pp 4304-4315.
- [30] Chang. L. K, Putcha. G. V, Deshmukh. M, Johnson Jr. E. M: Mitochondria involvement in the point of no return in neuronal apoptosis. *Biochimie* 2002, Vol 84, pp 223-231
- [31] Kroemer. G: Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, Vol 304, pp 433–435.
- [32] Ott. M, Robertson. J. D, Gogvadze. V, Zhivotovsky. B, Orrenious. S: Cytochrome C release from mitochondria proceeds by a two-step process. *P.N.A.S* 2002, Vol 99, Num 3, pp 1259-1263.
- [33] Kroemer. G: Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, Vol 304, pp 433–435.
- [34] Chipuk. J. E, Bouchier-Hayes. L, Green. D. R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death and Differentiation* 2006, Vol 13, pp 1396-1402.
- [35] Tait. S. W. G, Green. D. R: Mitochondrial Regulation of Cell Death; from *Additional Perspectives on Cell Survival and Cell Death*. Baehrecke. E. H, Green. D. R, Kornbluth, Salvesen. G. S (editors) 2013. Springer
- [36] Garrido. C, Galluzzi. L. Brunet. M, Puig. P. E, Didelot. C, Kroemer. G: Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation* 2006, Vol 13, pp 1423-1433.
- [37] Bhola. P. D, Latai. A: Mitochondria- Judges and Executioners of Cell Death Sentences. *Molecular Cell* 2016, Vol 61, pp 695-704
- [38] Oberst. A, Ichim. G, Tait, S. W. G: Mitochondrial Permeabilization: From Lethality to Vitality, from *Mitochondria and Cell Death in Biology and Diseases*. Yin. X-M, Dong. Z (editors) 2016. Springer. Chapter 11, pp 213-226.
- [39] Waterhouse. N. J, Green. D. R: +Mitochondria and Apoptosis: HQ or High-Security Prison? *Journal of Clinical Immunology* 1999, Vol 19, Num 6, pp 378-387
- [40] G, López. J, Murphy. D. J, Tait. S. W. G: Limited Mitochondrial Permeabilization Causes DNA Damage and Genomic Instability in the Absence of Cell Death. Ichim. *Molecular Cell* 2015, Vol 57, pp 860-872
- [41] Tang. H. L, Yuen. K. L, Tang. H. M, Fung. M. C: Reversibility of apoptosis in cancer cells. *British Journal of Cancer* 2009, Vol 100, 118-122.
- [42] Tang. H. M, Tang. H. M, Montell. D. J: Stress Induced Mutagenesis, Genetic Diversification, and Cell Survival via Anastasis, the Reversal of Late Stage Apoptosis; from *Stress Induced Mutagenesis*. Mittelman. D (editor). Springer 2013, Chapter 11, pp 223-241
- [43] Conde. R. V, Oliveira. P. F, Nunes. A. R, Rocha. C. S, Ramalhosa. E, Pereira. J. A, Alves. M. G, Silva. B. M: The progression from lower to a higher invasive stage bladder cancer is associates with sever alterations in glucose and pyruvate metabolism. *Experimenta cell research* 2015, Vol 335, pp 91-98

- [44] Huber. H. J, Dussmann. H, Kilbride. S. M, Rehm. M, Prehn. J. H. M: Glucose metabolism determines resistance of cancer cells to bioenergetic crisis after cytochrome-c release. *Molecular Systems Biology* 2011, Vol 7, Num 470, doi:10.1038/msb.2011.2
- [45] Gogvadze. V, Zhivotovsky. B, Orrenious. S: The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Molecular Aspects of Medicine* 2010, Vol 31, pp 60-74.
- [46] . Alberghina. L, Gaglio. D, Gelfi. C, Moresco. R. M, Mauri. G, Berolazzi. P, Messa. C, Gilardi. M. C, Chiaradonna. F, Vanoni. M: Cancer cell growth and survival as a system-level property sustained by enhanced glycolysis and mitochondrial metabolic remodelling *Frontiers in Physiology* 2012, Vol 3, Art 362, pp 1-22.
- [47] Shakeri. R, Kheirollahi. A, Davoodi. J.: Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochemie* 2017, Vol 135, pp 111-125.
- [48] Pradelli. L. A, Villa. E, Zunino. B, Marchetti. S, Ricci. J-E: Glucose metabolism is inhibited by caspases upon the induction of apoptosis. *Cell Death and Disease* 2014, 5, e1406, doi:101038/cddis2014371
- [49] Zamaraeva. M. V, Sabirov. R. Z, Maeno. E, Ando-Akatsuka. Y, Bessonova. S. V, Okada. Y: Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death and Differentiation* 2015, Vol 12, pp 1390-1397.
- [50] Chiarugi. A: "Simple but not simpler": toward a unified picture of energy requirements in cell death. *The FASEB Journal* 2005, Vol 19, pp 1783-1788
- [51] Tang H. M, Tang H. L: Anastasis: recovery from the brink of cell death. *Royal society open science* 2018. 5: 180442
- [52] Tang. H. L, Tang. H. M, Hardwick. J. M, Fung. M. C: Strategies for Tracking Anastasis, a Cell Survival Phenomenon that Reverses Apoptosis. *Journal of Visualized Experiments* 2015, Vol 96, e51964
- [53] Monian. P, Jiang. X: Clearing the final hurdles to mitochondrial apoptosis: Regulation post cytochrome C release. *Experimental Oncology* 2012, Vol 34, Num 3, pp 185-191.
- [54] Sun. G, Guzman. E, Balazanyan. V, Conner. C. M, Wong. K, Zhou. H. R, Kosik. S. K, Montell. D. J: A molecular signature for anastasis, recovering from the brink of apoptotic cell death. *The journal of cell biology* 2017. Doi:10.1083/jbc.201706134
- [55] Gortat. A, Sancho. M, Mondragón. L, Messeguer. A, Pérez-Payá. E, Orzáesz. M: Apaf1 inhibition promotes cell recovery from apoptosis. *Protein and Cell* 2015, Vol 6, Num 11, pp 822-843.
- [56] Mariño. G, Niso-Santano. M, Baehrecke. E. H, Kroemer. G: Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Natural Reviews/Molecular Cell Biology* 2014, Vol 5, pp 81-94.
- [57] Swart. C, Du Toit. A, Loos. B: Autophagy and the invisible line between life and death. *European Journal of Cell Biology* 2016, Vol 95, pp 598-610
- [58] Dudgeon. C, Qiu. W, Sun. Q, Zhang. L, Yu. J: Transcriptional Regulation of Apoptosis; from *Essentials of Apoptosis. A Guide for Basic and Clinical Research*. Yin. X. M, Dong. Z (editors). 2da edición. Human Press, Springer Science + Business Media 2009. Chapter 10, pp 239-260.
- [59] Fulda. S, Debatin. K-M: Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006, Vol 25, pp 4798-4811.
- [60] Hiebert. S. W, Lipp. M, Nevins. J. R: E1A-dependent trans. activation of the human MYC promoter is mediated be the E2F factor. *P.N.A.S* 1989, Vol 86, pp 3594-3598.

- [61] Bracken. A. P, Ciro. M, Cocito. A, Helin. K: E2F target genes: unravelling the biology. *TRENDS in Biochemical Sciences* 28, Vol 29, Num 8, 409-417.
- [62] Cellappaj. S. P, Heibert. S, Mudryl. M, Horowitz. J. M, Nevins. J. R: The E2F Transcription Factor Is a Cellular Target for the RB Protein. *Cell* 1991, Vol 65, pp 1053-1061.
- [63] Iaquina. P. J, Lees. J. A: Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Current Opinion in Cell Biology* 2007, Vol 19, pp 649-657.
- [64] Dimova. D. K, Dyson. N. J: The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces *Oncogen* 2005, Vol 24, pp 2810-2826.
- [65] Calzone. L, Zinovyev. A, Zhivotovsky. B: Understanding Different Types of Cell Death Using Systems Biology; from *Systems Biology of Apoptosis*. Larvik. I. N. Springer Science + Business Media 2013. Chapter 6, pp 125-143
- [66] Bentele. M, Larvik. I, Ulrich. M, Stößer, Heermann. D. W, Kalthoff. H, Krammer. P. H, Eils. R: Mathematical modeling reveals threshold mechanism in CD95-induced apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 2004, Vol 166, Num 6, pp 839-85.
- [67] Eissing. T, Conzelmann. H, Gilles. E. D, Allgöwer. F, Bullinger. E, Scheurich. P: Bistability Analyses of a Caspase Activation Model for Receptor-induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 2004, Vol 297, Num 35, pp 36892-36897
- [68] Neumann. L, Pforr. C, Beaudouin. J, Pappa. A, Fricker. N, Krammer. P. H, Larvik. I. N: Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. *Molecular Systems Biology*. Vol 6, Num 352, doi:10.1038/msb.2010.6
- [69] Fussengger. M, Baillet. J. E, Varner. J: A mathematical model of caspase function in apoptosis. *Nature Biotechnology* 2000, Vol 18, pp 768-774.
- [70] Stucki. J. W, Simon. H-U: Mathematical modeling of the regulation of caspase -3 activation and degradation. *The Journal of Theoretical Biology* 2005, Vol 234, pp 123-131.
- [71] Legewie. S, Blüthgen. N, Herzel. H: Mathematical Modeling Identifies Inhibitors of Apoptosis as Mediators of Positive feedback and Bistability. *PLoS Computational Biology* 2006, 2(9): e120
- [72] Dússmann. H, Rehm. M, Conacannon. C. G, Anguissola. S, Würstle. M, Kacmar. S, Völler. P, Huber. H. J, Prehn. J. H. M: Single-cell quantification of Bax activation and mathematical modelling suggest pore formation on minimal mitochondrial Bax accumulation *Cell Death and Differentiation* 2010, Vol 17, pp 278-290.
- [73] Calzone. L, Tournier. L, Fourquet. S, Thieffry. D, Zhivotovsky, Bariollot. E, Zinovyev: Mathematical Modelling of Cell-Fate Decision in Response to Death Receptor Engagement. *PLoS Computational Biology* 2010, 6(3): e1000702. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000702.
- [74] Schlatter. R, Schmich. K, Vizcarra. I. A, Scheurich. P, Sauter. T, Borner. C, Ederer. M, Merfort. I, Sawodny. O: ON/OFF and Beyond – A Boolean Model of Apoptosis. *PLoS Computational Biology* 2009, 5(12): e1000595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000595.
- [75] Huber. H. J, Dussmann. H, Kilbride. S. M, Rehm. M, Prehn. J. H. M: Glucose metabolism determines resistance of cancer cells to bioenergetic crisis after cytochrome-c release. *Molecular Systems Biology* 2011, Vol 7, Num 470, doi:10.1038/msb.2011.2.
- [76] Huber. H. J, Dussmann. H, Kilbride. S. M, Rehm. M, Prehn. J. H. M: In silico modelling of apoptosis induced by photodynamic therapy. *Journal of Theoretical Biology* 2018, Vol 438, pp 8-17.

7) Anexos

7.1) Leyes de velocidad y ecuaciones diferenciales

Modelo de Apoptosis de Legewie et al.

Leyes de Velocidad

$$v_1 = k_1 \cdot A^* \cdot C9 - k_{1r} \cdot A^* C9$$

$$v_2 = k_2 \cdot C9 \cdot C3$$

$$v_3 = k_3 \cdot C3 \cdot A^* C9$$

$$v_4 = k_4 \cdot C9 \cdot C3^*$$

$$v_5 = k_5 \cdot A^* C9 \cdot C3^*$$

$$v_6 = k_6 \cdot C3 \cdot C9^*$$

$$v_7 = k_7 \cdot C3 \cdot A^* C9^*$$

$$v_8 = k_8 \cdot C9^* \cdot A^* - k_{8r} \cdot A^* C9^*$$

$$v_9 = k_9 \cdot C9 \cdot X - k_{9r} \cdot C9 X$$

$$v_{10} = k_{10} \cdot A^* C9 \cdot X - k_{10r} \cdot A^* C9 X$$

$$v_{11} = k_{11} \cdot C9^* \cdot X - k_{11r} \cdot C9^* X$$

$$v_{12} = k_{12} \cdot A^* C9^* \cdot X + k_{12r} \cdot A^* C9^* X$$

$$v_{13} = k_{13} \cdot C9 X \cdot A^* - k_{13r} \cdot A^* C9 X$$

$$v_{14} = k_{14} \cdot C9^* X \cdot A^* - k_{14r} \cdot A^* C9^* X$$

$$v_{15} = k_{15} \cdot C3^* \cdot X - k_{15r} \cdot C3^* X$$

$$v_{16} = k_{16r} - k_{16} \cdot A^*$$

$$v_{17} = k_{17r} - k_{17} \cdot C9$$

$$v_{18} = k_{18r} - k_{18} \cdot X$$

$$v_{19} = k_{19} \cdot C9 X$$

$$v_{20} = k_{20} \cdot A^* C9 X$$

$$v_{21} = k_{21} \cdot A^* C9$$

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

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

$$v_{24} = k_{24} \cdot C3^* X$$

$$v_{25} = k_{25} \cdot C9^* X$$

$$v_{26} = k_{26} \cdot C9^*$$

$$v_{27} = k_{27} \cdot A^* C9^*$$

$$v_{28} = k_{28} \cdot A^* C9^*$$

Ecuaciones

$$\frac{dA^*}{dt} = Eq_1 = -v_1 - v_{13} - v_8 - v_{14} + v_{16}$$

$$\frac{dC9}{dt} Eq_2 = -v_1 - v_9 - v_4 + v_{17}$$

$$\frac{dX}{dt} = Eq_3 = -v_9 - v_{10} - v_{15} - v_{11} - v_{12} + v_{18}$$

$$\frac{dC3}{dt} = Eq_4 = -v_2 - v_3 - v_6 - v_7 + v_{22}$$

$$\frac{dC9X}{dt} = Eq_5 = v_9 - v_{13} - v_{19}$$

$$\frac{dA^* C9 X}{dt} = Eq_6 = v_{10} + v_{13} - v_{20}$$

$$\frac{dA^* C9}{dt} = Eq_7 = v_1 - v_{10} - v_5 - v_{21}$$

$$\frac{dC3^*}{dt} = Eq_8 = v_2 + v_3 - v_{15} + v_6 + v_7 - v_{23}$$

$$\frac{dC3^* X}{dt} = Eq_9 = v_{15} - v_{24}$$

$$\frac{dC9^* X}{dt} = Eq_{10} = v_{11} - v_{14} - v_{25}$$

$$\frac{dC9^*}{dt} = Eq_{11} = v_4 - v_8 - v_{11} - v_{26}$$

$$\frac{dA^*C9^*X}{dt} = Eq_{13} = v_{12} + v_{14} - v_{28}$$

$$\frac{dA^*C9^*}{dt} = Eq_{12} = v_5 + v_8 - v_{12} - v_{27}$$

Módulo de activación

Leyes de velocidad

$$v_{1L} = k_{1L} \cdot SMAC_i \cdot BAK + k_{1Lr} \cdot SMAC_c$$

$$v_{2L} = -k_{2L} \cdot CytC_i \cdot BAK + k_{2Lr} \cdot CytC_c$$

$$v_{3L} = k_{3Lr} - k_{3L} \cdot SMAC_i$$

$$v_{4L} = k_{4Lr} - k_{4L} \cdot CytC_i$$

$$v_{5L} = k_{5L} \cdot SMAC_c \cdot X + k_{5Lr} \cdot SMAC_c X$$

$$v_{6L} = k_{6Lr} - k_{6L} \cdot RCh$$

$$v_{7L} = k_{7L} \cdot CytC_i \cdot RCh - k_{7Lr} \cdot RCh \cdot CytC_i$$

$$v_{8L} = k_{8L} \cdot CytC_c \cdot AA + k_{8Lr} \cdot A^*$$

$$v_{9L} = k_{9L} \cdot P_{im} \cdot ADP \cdot RCh \cdot CytC_i$$

$$v_{10L} = k_{10L} \cdot ATP$$

$$v_{11L} = k_{11Lr} - k_{11L} \cdot AA$$

Ecuaciones

$$\frac{dA^*}{dt} = Eq_1 = v_{8L}$$

$$\frac{dSMAC_i}{dt} = Eq_2 = -v_{1L} + v_{3L}$$

$$\frac{dSMAC_c}{dt} = Eq_3 = v_{1L} - v_{5L}$$

$$\frac{dCytC_i}{dt} = Eq_4 = -v_{2L} + v_{4L} - v_{7L}$$

$$\frac{dCytC_c}{dt} = Eq_5 = v_{2L} - v_{8L}$$

$$\frac{dSMAC_c X}{dt} = Eq_6 = v_{5L}$$

$$\frac{dRCh}{dt} = Eq_7 = v_{6L} - v_{7L}$$

$$\frac{dRCh \cdot CytC_i}{dt} = Eq_8 = v_{7L}$$

$$\frac{dATP}{dt} = Eq_9 = v_{9L} - v_{10L}$$

$$\frac{dAA}{dt} = Eq_{10} = v_{11L} - v_{8L}$$

Modelo de glicólisis reducido de Mulukutla et al.

Leyes de velocidad

$$r_{ALD} = \frac{a F16BP_c + b}{c F16BP_c + d}$$

$$a = \frac{V_{mf}^{ALD}}{K_{F16BP}^{ALD}}$$

$$b = \frac{V_{mr}^{ALD} \cdot GAP_c \cdot DHAP_c}{K_{GAP}^{ALD} K_{i,DHAP}^{ALD}}$$

$$c = F16BP_c \left(\frac{1}{K_{F16BP}^{ALD}} + \frac{K_{DHAP}^{ALD} \cdot F16BP_c \cdot GAP_c}{K_{i,F16BP}^{ALD} K_{GAP}^{ALD} K_{i,DHAP}^{ALD}} \right)$$

$$d = 1 + \frac{23BPG_c}{K_{i,23BPG}^{ALD}} + \frac{K_{DHAP}^{ALD} \cdot GAP_c}{K_{GAP}^{ALD} K_{i,DHAP}^{ALD}} \left(1 + \frac{23BPG_c}{K_{i,23BPG}^{ALD}} \right) + \frac{DHAP_c}{K_{i,DHAP}^{ALD}} + \frac{DHAP_c \cdot GAP_c}{K_{GAP}^{ALD} K_{i,DHAP}^{ALD}}$$

$$r_{PFK} = \frac{V_f^{PFK} \frac{MgATP_c F6P_c}{K_{F6P}^{PFK} K_{MgATP}^{PFK}} - V_r^{PFK} \frac{MgADP_c F16BP_c}{K_{MgADP}^{PFK} K_{F16BP}^{PFK}}}{\left(1 + \frac{F6P_c}{K_{F6P}^{PFK}}\right) \left(1 + \frac{MgATP}{K_{MgATP}^{PFK}}\right) + \left(1 + \frac{F16BP_c}{K_{F16BP}^{PFK}}\right) \left(1 + \frac{MgADP_c}{K_{MgADP}^{PFK}}\right) - 1} \frac{1}{N_{PFK}}$$

$$N_{PFK} = 1 + p/q$$

$$p = L_{PFK} \left(1 + \frac{ATP_c}{K_{ATP}^{PFK}}\right)^4 \left(1 + \frac{Mg_c}{K_{Mg}^{PFK}}\right)^4 \left(1 + \frac{23BPG_c}{K_{23BPG}^{PFK}}\right)^4$$

$$q = \left(1 + \frac{F6P_c}{K_{F6P}^{PFK}} + \frac{F16BP_c}{K_{F16BP}^{PFK}}\right)^4 \left(1 + \frac{AMP_c}{K_{AMP}^{PFK}}\right)^4 \left(1 + \frac{G16BP_c}{K_{G16BP}^{PFK}}\right)^4 \left(1 + \frac{P_i}{K_{P_i}^{PFK}}\right)^4 \left(1 + \frac{F26BP_c}{K_{F26BP}^{PFK}}\right)^4$$

Ecuaciones

$$\frac{dF16BP_c}{dt} = r_{PFK} - r_{ALD}$$

Modelo de Apoptosis extendida

Leyes de Velocidad

$$v_1 = k_1 \cdot A^* \cdot C9 - k_{1r} \cdot A^* C9$$

$$v_{19} = k_{19} \cdot C9X$$

$$v_2 = k_2 \cdot C9 \cdot C3$$

$$v_{20} = k_{20} \cdot A^* C9X$$

$$v_3 = k_3 \cdot C3 \cdot A^* C9$$

$$v_{21} = k_{21} \cdot A^* C9$$

$$v_4 = k_4 \cdot C9 \cdot C3^*$$

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

$$v_5 = k_5 \cdot A^* C9 \cdot C3^*$$

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

$$v_6 = k_6 \cdot C3 \cdot C9^*$$

$$v_{24} = k_{24} \cdot C3^* X$$

$$v_7 = k_7 \cdot C3 \cdot A^* C9^*$$

$$v_{25} = k_{25} \cdot C9^* X$$

$$v_8 = k_8 \cdot C9^* \cdot A^* - k_{8r} \cdot A^* C9^*$$

$$v_{26} = k_{26} \cdot C9^*$$

$$v_9 = k_9 \cdot C9 \cdot X - k_{9r} \cdot C9X$$

$$v_{27} = k_{27} \cdot A^* C9^*$$

$$v_{10} = k_{10} \cdot A^* C9 \cdot X - k_{10r} \cdot A^* C9X$$

$$v_{28} = k_{28} \cdot A^* C9^*$$

$$v_{11} = k_{11} \cdot C9^* \cdot X - k_{11r} \cdot C9^* X$$

$$v_{1L} = k_{1L} \cdot SMAC_i \cdot BAK + k_{1Lr} \cdot SMAC_c$$

$$v_{12} = k_{12} \cdot A^* C9^* \cdot X + k_{12r} \cdot A^* C9^* X$$

$$v_{2L} = -k_{2L} \cdot CytC_i \cdot BAK + k_{2Lr} \cdot CytC_c$$

$$v_{13} = k_{13} \cdot C9X \cdot A^* - k_{13r} \cdot A^* C9X$$

$$v_{3L} = k_{3Lr} - k_{3L} \cdot SMAC_i$$

$$v_{14} = k_{14} \cdot C9^* X \cdot A^* - k_{14r} \cdot A^* C9^* X$$

$$v_{4L} = k_{4Lr} - k_{4L} \cdot CytC_i$$

$$v_{15} = k_{15} \cdot C3^* \cdot X - k_{15r} \cdot C3^* X$$

$$v_{5L} = k_{5L} \cdot SMAC_c \cdot X + k_{5Lr} \cdot SMAC_c X$$

$$v_{16} = k_{16r} - k_{16} \cdot A^*$$

$$v_{6L} = k_{6Lr} - k_{6L} \cdot RCh$$

$$v_{17} = k_{17r} - k_{17} \cdot C9$$

$$v_{7L} = k_{7L} \cdot CytC_i \cdot RCh - k_{7Lr} \cdot RCh \cdot CytC_i$$

$$v_{18} = k_{18r} - k_{18} \cdot X$$

$$v_{8L} = k_{8L} \cdot CytC_c \cdot AA + k_{8Lr} \cdot A^*$$

$$v_{9L} = k_{9L} \cdot P_{im} \cdot ADP \cdot RChCytC_i$$

$$v_{11L} = k_{11Lr} - k_{11L} \cdot AA$$

$$v_{10L} = k_{10L} \cdot ATP$$

Ecuaciones

$$\frac{dA^*}{dt} = Eq_1 = -v_1 - v_{13} - v_8 - v_{14} + v_{8L}$$

$$\frac{dA^*C9^*}{dt} = Eq_{12} = v_5 + v_8 - v_{12} - v_{27}$$

$$\frac{dC9}{dt} Eq_2 = -v_1 - v_9 - v_4 + v_{17}$$

$$\frac{dA^*C9^*X}{dt} = Eq_{13} = v_{12} + v_{14} - v_{28}$$

$$\frac{dX}{dt} = Eq_3 = -v_9 - v_{10} - v_{15} - v_{11} - v_{12} + v_{18} - v_{5L}$$

$$\frac{dSMAC_i}{dt} = Eq_{14} = -v_{1L} + v_{3L}$$

$$\frac{dSMAC_c}{dt} = Eq_{15} = v_{1L} - v_{5L}$$

$$\frac{dC3}{dt} = Eq_4 = -v_2 - v_3 - v_6 - v_7 + v_{22}$$

$$\frac{dCytC_i}{dt} = Eq_{16} = -v_{2L} + v_{4L} - v_{7L}$$

$$\frac{dC9X}{dt} = Eq_5 = v_9 - v_{13} - v_{19}$$

$$\frac{dCytC_c}{dt} = Eq_{17} = v_{2L} - v_{8L}$$

$$\frac{dA^*C9X}{dt} = Eq_6 = v_{10} + v_{13} - v_{20}$$

$$\frac{dSMAC_cX}{dt} = Eq_{18} = v_{5L}$$

$$\frac{dA^*C9}{dt} = Eq_7 = v_1 - v_{10} - v_5 - v_{21}$$

$$\frac{dRCh}{dt} = Eq_{19} = v_{6L} - v_{7L}$$

$$\frac{dC3^*}{dt} = Eq_8 = v_2 + v_3 - v_{15} + v_6 + v_7 - v_{23}$$

$$\frac{dRChCytC_i}{dt} = Eq_{20} = v_{7L}$$

$$\frac{dC3^*X}{dt} = Eq_9 = v_{15} - v_{24}$$

$$\frac{dATP}{dt} = Eq_{21} = v_{9L} - v_{10L}$$

$$\frac{dC9^*X}{dt} = Eq_{10} = v_{11} - v_{14} - v_{25}$$

$$\frac{dAA}{dt} = Eq_{22} = v_{11L} - v_{8L}$$

$$\frac{dC9^*}{dt} = Eq_{11} = v_4 - v_8 - v_{11} - v_{26}$$

Modelo integrado apoptosis glicólisis

Leyes de Velocidad

$$v_1 = k_1 \cdot A^* \cdot C9 \cdot ATP - k_{1r} \cdot A^*C9$$

$$v_9 = k_9 \cdot C9 \cdot X - k_{9r} \cdot C9X$$

$$v_2 = k_2 \cdot C9 \cdot C3$$

$$v_{10} = k_{10} \cdot A^*C9 \cdot X - k_{10r} \cdot A^*C9X$$

$$v_3 = k_3 \cdot C3 \cdot A^*C9$$

$$v_{11} = k_{11} \cdot C9^* \cdot X - k_{11r} \cdot C9^*X$$

$$v_4 = k_4 \cdot C9 \cdot C3^*$$

$$v_{12} = k_{12} \cdot A^*C9^* \cdot X + k_{12r} \cdot A^*C9^*X$$

$$v_5 = k_5 \cdot A^*C9 \cdot C3^*$$

$$v_{13} = k_{13} \cdot C9X \cdot A^* \cdot ATP - k_{13r} \cdot A^*C9X$$

$$v_6 = k_6 \cdot C3 \cdot C9^*$$

$$v_{14} = k_{14} \cdot C9^*X \cdot A^* \cdot ATP - k_{14r} \cdot A^*C9^*X$$

$$v_7 = k_7 \cdot C3 \cdot A^*C9^*$$

$$v_{15} = k_{15} \cdot C3^* \cdot X - k_{15r} \cdot C3^*X$$

$$v_8 = k_8 \cdot C9^* \cdot A^* \cdot ATP - k_{8r} \cdot A^*C9^*$$

$$v_{16} = k_{16r} - k_{16} \cdot A^*$$

$$v_{17} = k_{17r} - k_{17} \cdot C9$$

$$v_{18} = k_{18r} - k_{18} \cdot X$$

$$v_{19} = k_{19} \cdot C9X$$

$$v_{20} = k_{20} \cdot A^*C9X$$

$$v_{21} = k_{21} \cdot A^*C9$$

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

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

$$v_{24} = k_{24} \cdot C3^*X$$

$$v_{25} = k_{25} C9^*X$$

$$v_{26} = k_{26} C9^*$$

$$v_{27} = k_{27} \cdot A^*C9^*$$

$$v_{28} = k_{28} \cdot A^*C9^*$$

$$v_{1L} = k_{1L} \cdot SMAC_i \cdot BAK + k_{1Lr} \cdot SMAC_c$$

$$v_{2L} = -k_{2L} \cdot CytC_i \cdot BAK + k_{2Lr} \cdot CytC_c$$

$$v_{3L} = k_{3Lr} - k_{3L} \cdot SMAC_i$$

$$v_{4L} = k_{4Lr} - k_{4L} \cdot CytC_i$$

$$v_{5L} = k_{5L} \cdot SMAC_c \cdot X + k_{5Lr} SMAC_c X$$

$$v_{6L} = k_{6Lr} - k_{6L} RCh$$

$$v_{7L} = k_{7L} CytC_i RCh - k_{7Lr} RChCytC_i$$

$$v_{8L} = k_{8L} \cdot CytC_c \cdot AA + k_{8Lr} \cdot A^*$$

$$v_{9L} = k_{9L} \cdot P_{im} \cdot ADP \cdot RChCytC_i$$

$$v_{10L} = k_{10L} \cdot ATP$$

$$v_{11L} = k_{11Lr} - k_{11L} \cdot AA$$

$$r_{ALD} = \frac{a F16BP_c + b}{c F16BP_c + d}$$

$$a = \frac{V_{mf}^{ALD}}{K_{F16BP}^{ALD}}$$

$$b = \frac{V_{mr}^{ALD} GAP_c DHAP_c}{K_{GAP}^{ALD} K_{i,DHAP}^{ALD}}$$

$$c = F16BP_c \left(\frac{1}{K_{F16BP}^{ALD}} + \frac{K_{DHAP}^{ALD} F16BP_c GAP_c}{K_{i,F16BP}^{ALD} K_{GAP}^{ALD} K_{i,DHAP}^{ALD}} \right)$$

$$d = 1 + \frac{23BPG_c}{K_{i,23BPG}^{ALD}} + \frac{K_{DHAP}^{ALD} GAP_c}{K_{GAP}^{ALD} K_{i,DHAP}^{ALD}} \left(1 + \frac{23BPG_c}{K_{i,23BPG}^{ALD}} \right) + \frac{DHAP_c}{K_{i,DHAP}^{ALD}} + \frac{DHAP_c GAP_c}{K_{GAP}^{ALD} K_{i,DHAP}^{ALD}}$$

$$r_{PFK} = \frac{\frac{v_f^{PFK} MgATP_c F6P_c}{K_{F6P}^{PFK} K_{MgATP}^{PFK}} - \frac{v_r^{PFK} MgADP_c F16BP_c}{K_{MgADP}^{PFK} K_{F16BP}^{PFK}}}{\left(\left(1 + \frac{F6P_c}{K_{F6P}^{PFK}} \right) \left(1 + \frac{MgATP_c}{K_{MgATP}^{PFK}} \right) + \left(1 + \frac{F16BP_c}{K_{F16BP}^{PFK}} \right) \left(1 + \frac{MgADP_c}{K_{MgADP}^{PFK}} \right) - 1 \right)} \frac{1}{N_{PFK}}$$

$$N_{PFK} = 1 + p/q$$

$$p = L_{PFK} \left(1 + \frac{ATP_c}{K_{ATP}^{PFK}} \right)^4 \left(1 + \frac{Mg_c}{K_{Mg}^{PFK}} \right)^4 \left(1 + \frac{23BPG_c}{K_{23BPG}^{PFK}} \right)^4$$

$$q = \left(1 + \frac{F6P_c}{K_{F6P}^{PFK}} + \frac{F16BP_c}{K_{F16BP}^{PFK}} \right)^4 \left(1 + \frac{AMP_c}{K_{AMP}^{PFK}} \right)^4 \left(1 + \frac{G16BP_c}{K_{G16BP}^{PFK}} \right)^4 \left(1 + \frac{Pi_c}{K_{Pi}^{PFK}} \right)^4 \left(1 + \frac{F26BP_c}{K_{F26BP}^{PFK}} \right)^4$$

Ecuaciones

$$\frac{dA^*}{dt} = Eq_1 = -v_1 - v_{13} - v_8 - v_{14} + v_{8L}$$

$$\frac{dC9}{dt} Eq_2 = -v_1 - v_9 - v_4 + v_{17}$$

$$\frac{dX}{dt} = Eq_3 = -v_9 - v_{10} - v_{15} - v_{11} - v_{12} + v_{18} - v_{5L}$$

$$\frac{dC3}{dt} = Eq_4 = -v_2 - v_3 - v_6 - v_7 + v_{22}$$

$$\frac{dC9X}{dt} = Eq_5 = v_9 - v_{13} - v_{19}$$

$$\frac{dA^*C9X}{dt} = Eq_6 = v_{10} + v_{13} - v_{20}$$

$$\frac{dA^*C9}{dt} = Eq_7 = v_1 - v_{10} - v_5 - v_{21}$$

$$\frac{dC3^*}{dt} = Eq_8 = v_2 + v_3 - v_{15} + v_6 + v_7 - v_{23}$$

$$\frac{dC3^*X}{dt} = Eq_9 = v_{15} - v_{24}$$

$$\frac{dC9^*X}{dt} = Eq_{10} = v_{11} - v_{14} - v_{25}$$

$$\frac{dC9^*}{dt} = Eq_{11} = v_4 - v_8 - v_{11} - v_{26}$$

$$\frac{dA^*C9^*}{dt} = Eq_{12} = v_5 + v_8 - v_{12} - v_{27}$$

$$\frac{dF16BP_c}{dt} = Eq_{23} = r_{PFK} - r_{ALD}$$

$$\frac{dA^*C9^*X}{dt} = Eq_{13} = v_{12} + v_{14} - v_{28}$$

$$\frac{dSMAC_i}{dt} = Eq_{14} = -v_{1L} + v_{3L}$$

$$\frac{dSMAC_c}{dt} = Eq_{15} = v_{1L} - v_{5L}$$

$$\frac{dCytC_i}{dt} = Eq_{16} = -v_{2L} + v_{4L} - v_{7L}$$

$$\frac{dCytC_c}{dt} = Eq_{17} = v_{2L} - v_{8L}$$

$$\frac{dSMAC_cX}{dt} = Eq_{18} = v_{5L}$$

$$\frac{dRCh}{dt} = Eq_{19} = v_{6L} - v_{7L}$$

$$\frac{dRChCytC_i}{dt} = Eq_{20} = v_{7L}$$

$$\frac{dATP}{dt} = Eq_{21} = v_{9L} - v_{10L} + r_{ALD}$$

$$\frac{dAA}{dt} = Eq_{22} = v_{11L} - v_{8L}$$

7.2) Valores por defecto de los parámetros.

Los valores listados a continuación corresponden a los valores tomados por defecto tomados por los parámetros del sistema, a menos que se explicita lo contrario en la sección correspondiente. Todos los parámetros se encuentran expresados en nM y s según corresponda.

Modelo de Legewie et al.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
k_1	$2 \times 10^{-3} nM^{-1} \cdot s^{-1}$	k_{1r}	$0.1 s^{-1}$	k_{25}	$1/1000 s^{-1}$
k_2	$5 \times 10^{-6} nM^{-1} \cdot s^{-1}$			k_{26}	$1/1000 s^{-1}$
k_3	$3.5 \times 10^{-5} nM^{-1} \cdot s^{-1}$			k_{27}	$1/1000 s^{-1}$
k_4	$2 \times 10^{-4} nM^{-1} \cdot s^{-1}$			k_{28}	$1/1000 s^{-1}$
k_5	$2 \times 10^{-4} nM^{-1} \cdot s^{-1}$				
k_6	$5 \times 10^{-5} nM^{-1} \cdot s^{-1}$				
k_7	$3.5 \times 10^{-4} nM^{-1} \cdot s^{-1}$				
k_8	$2 \times 10^{-3} nM^{-1} \cdot s^{-1}$	k_{8r}	$0.1 s^{-1}$		
k_9	$1 \times 10^{-3} nM^{-1} \cdot s^{-1}$	k_{9r}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$		
k_{10}	$1 \times 10^{-3} nM^{-1} \cdot s^{-1}$	k_{10r}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$		
k_{11}	$1 \times 10^{-3} nM^{-1} \cdot s^{-1}$	k_{11r}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$		
k_{12}	$1 \times 10^{-3} nM^{-1} \cdot s^{-1}$	k_{12r}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$		
k_{13}	$2 \times 10^{-3} nM^{-1} \cdot s^{-1}$	k_{13r}	$0.1 s^{-1}$		
k_{14}	$2 \times 10^{-3} nM^{-1} \cdot s^{-1}$	k_{14r}	$0.1 s^{-1}$		
k_{15}	$3 \times 10^{-3} nM^{-1} \cdot s^{-1}$	k_{15r}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$		
k_{16}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$	k_{16r}	$0.02 nM \cdot s^{-1}$		
k_{17}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$	k_{17r}	$0.02 nM \cdot s^{-1}$		
k_{18}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$	k_{18r}	$0.04 nM \cdot s^{-1}$		
k_{19}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$				
k_{20}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$				
k_{21}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$				
k_{22}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$	k_{22r}	$0.2 nM \cdot s^{-1}$		
k_{23}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$				
k_{24}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$				

Módulo de activación

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
k_{1L}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$	k_{1Lr}	$1 \times 10^{-3} nM^{-1} \cdot s^{-1}$
k_{2L}	$1 s^{-1}$	k_{2Lr}	$0.1 nM^{-1} \cdot s^{-1}$
k_{3L}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$	k_{3Lr}	$1 \times 10^{-3} nM \cdot s^{-1}$
k_{4L}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$	k_{4Lr}	$1 \times 10^{-3} nM \cdot s^{-1}$
k_{5L}	$1 \times 10^{-3} nM^{-1} \cdot s^{-1}$	k_{5Lr}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$
k_{6L}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$	k_{6Lr}	$1 \times 10^{-3} nM^{-1} \cdot s^{-1}$
k_{7L}	$1 \times 10^{-3} nM^{-1} \cdot s^{-1}$	k_{7Lr}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$
k_{8L}	$1 \times 10^{-3} nM^{-1} \cdot s^{-1}$	k_{8Lr}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$
k_{9L}	$1 \times 10^{-7} nM^{-2} \cdot s^{-1}$		
k_{10L}	$0.1 s^{-1}$		
k_{11L}	$1 \times 10^{-3} s^{-1}$	k_{11Lr}	$1 \times 10^{-3} nM \cdot s^{-1}$
AXP_{total}	$2 \times 10^6 nM^{-1}$	P_{im}	$2.5 \times 10^6 nM^{-1}$

Modelo de glicólisis reducida de Mulukutla et al.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
V_f^{PFK}	$15500000/36 nM^{-1} \cdot s^{-1}$	V_r^{PFK}	$67800000/36 nM^{-1} \cdot s^{-1}$
K_{F6P}^{PFK}	$60000 nM$	K_{MgATP}^{PFK}	$68000 nM$
K_{MgADP}^{PFK}	$540000 nM$	K_{F16BP}^{PFK}	$650000 nM$
K_{F26BP}^{PFK}	$5500 nM$	K_{G16BP}^{PFK}	$100000 nM$
K_{ATP}^{PFK}	$100000 nM$	K_{AMP}^{PFK}	$300000 nM$
K_{Mg}^{PFK}	$200000 nM$	K_{Pi}^{PFK}	$3000000 nM$
K_{23BPG}^{PFK}	$500000 nM$	L_{PFK}	2000
V_{mf}^{ALD}	$6750000/36 nM \cdot s^{-1}$	V_{mr}^{ALD}	$23200000/36 nM \cdot s^{-1}$
K_{F16BP}^{ALD}	$50000 nM$	$K_{i,F16BP}^{ALD}$	$198000 nM$
K_{DHAP}^{ALD}	$35000 nM$	$K_{i,DHAP}^{ALD}$	$11000 nM$

K_{GAP}^{ALD}	189000 nM	$K_{i,23BPG}^{ALD}$	1500000 nM
$DHAP_c$	40000 nM	$MgATP_c$	2690000 nM
GAP_c	20000 nM	$MgADP_c$	460000 nM
$23BPG_c$	3000000 nM	Mg_c	700000 nM
AMP_c	30000 nM	$G16BP_c$	100000 nM
Pi_c	2500000 nM	$F26BP_c$	1000000 nM
$F6P_c$	100000 nM	ATP_c	310000 nM
ADP_c	540000 nM		

7.3) Glosario

Anastasis: palabra de origen griego que significa evento de “volver a la vida”. Actualmente se utiliza para denominar el proceso por el cual células que están ejecutando algún programa de muerte, logran revertirlo y sobrevivir.

Apaf-1: Apoptotic Protease Activating Factor -1, es una proteína involucrada en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Es capaz de formar un complejo conocido como Apoptosoma y activar la caspasa 9.

Apoptosis: término de origen griego que significa “precipitarse o caer hacia la muerte”. Básicamente se utiliza para denominar a los mecanismos de muerte celular programada que tienen como resultado el fenotipo apoptótico característico (condensación y fragmentación nuclear, exposición de fosfatidilserina, formación de cuerpos apoptóticos, etc)

Apoptosoma (A*): Complejo macromolecular formado por un heptámero de moléculas de Apaf-1 cada una unida a una molécula de citocromo C y una molécula de ATP (esta última es necesaria para permitir la activación de la caspasa 9)

BAK: Bcl-2 Antagonist Killer, proteína proapoptótica de la familia Bcl-2, con homología BH1-BH3. En respuesta a diferentes señales es capaz de insertarse en la membrana mitocondrial externa formando poros en la misma.

BAX: Bcl-2 Associated X protein, idem a BAK

Bcl-2: B cell lymphoma. Es una proteína identificada como responsable de promover la resistencia a la apoptosis (antiapoptótica). Antagoniza otras proteínas proapoptóticas, secuestrándolas y su sobreexpresión se ha observado en líneas celulares transformadas. Le da nombre a la familia de proteínas Bcl-2.

Biestable: Se dice que un sistema es biestable si presenta dos estados estacionarios estables

BID: BH3 Interacting Domain death antagonist, uno de los miembros de las proteínas Bcl-2 proapoptóticas BH3-only (solo tienen un dominio de homología con Bcl-2, BH3). Promueve la formación de poros en la membrana mitocondrial externa. Es activado por la caspasa 8 durante la activación de la vía extrínseca siendo su forma activa tBID (truncated BID), actuando como punto de conexión que permite la retroalimentación de la vía intrínseca por la vía extrínseca.

BIM: Bcl-2 Interacting Mediator of cell death, otro miembro BH3 only de la familia Bcl-2. Promueve la formación de poros en la membrana mitocondrial externa.

Caspasas: Familia de cisteín proteasas que clivan diferentes proteínas blanco en residuos específicos de ácido aspártico. Globalmente se clasifican en caspasas iniciadoras (que inician la cascada de caspasas, o sea clivan otras caspasas) y caspasas ejecutoras (clivan otras proteínas celulares)

c-FLIP: FLICE Like Inhibitor Protein. Es una molécula estructuralmente similar a la caspasa 8 pero catalíticamente inactiva. Su presencia en el complejo DISC se atribuye a que sus diferentes isoformas pueden formar heterodímeros con caspasa 8 y de esta manera modular el nivel de activación de la vía.

Ciclo de Krebs: también conocido como ciclo del citrato, es un ciclo dentro del metabolismo celular que principalmente utiliza como base Acetil-CoA y permite la producción de equivalentes de reducción que luego son utilizados en la cadena respiratoria.

Citocromo C: proteína pequeña con un grupo prostético Hemo (porfirina coordinada con un átomo de Fe). Participa en la cadena de transporte de electrones o cadena respiratoria, transfiriendo electrones del complejo III (citocromo c reductasa) al IV (citocromo c oxidasa). También participa en la vía intrínseca de la apoptosis, formando parte del apoptosoma.

DISC: Death Inducing Signaling Complex, es un complejo macromolecular que funciona como plataforma de activación de la caspasa 8. Está formado por el receptor FAS, la molécula adaptadora FADD y cFLIP en sus diferentes isoformas.

E2F: Factor de transcripción encargado de regular la progresión del ciclo celular en el punto de control G1/S. Es inhibido por proteínas de la familia pRB. También actúa como regulador de la apoptosis.

Estado estacionario: Estado de un sistema en el que las variables se mantienen constantes en el tiempo.

FADD: FAS Associated Death Domain, molécula adaptadora que permite la interacción entre FAS y la caspasa 8, promoviendo el reclutamiento de esta última.

Fas y FasL: Uno de los receptores de membrana que puede activar la vía extrínseca de la apoptosis y su respectivo ligando. También es conocido como CD95. Permite la transducción de las señales externas de muerte al interior celular.

Fosforilación oxidativa: Proceso de síntesis de ATP a nivel mitocondrial. Utiliza el gradiente de protones generado por la cadena de transporte de electrones para que la enzima ATP sintasa sintetice a ATP. Tiene un rendimiento energético mucho mayor que las fosforilaciones a nivel de sustrato (por ejemplo, la glicólisis)

Histéresis: Propiedad de los sistemas dinámicos. Implica que dado un sistema, el camino para ir de un estado "a" a un estado "b" es diferente que el camino reverso.

MAPK: Mitogen - Activated Protein Kinase, también conocida como ERK, quinasa activada por una cascada de fosforilación que participa en diferentes procesos de señalización celular.

Mdm2: Murine doble minute 2, proteína ubiquin-ligasa E3 que promueve la degradación del factor de transcripción p53 vía el proteasoma

MOMP: Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial externa. En general ocurre vía la formación de poros en la misma.

Necrosis: forma de muerte celular considerada accidental o no organizada. Se caracteriza por la pérdida de la integridad de la membrana plasmática

NfκB: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, es un factor de transcripción que participa en diferentes procesos celulares de sobrevivencia y en el funcionamiento de las células inmunes.

NOXA: También conocida como: phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMAIP1). Es una proteína proapoptótica BH3 only de la familia Bcl-2.

p53: Factor de transcripción que participa en diferentes procesos de detención del ciclo celular y reparación del genoma. Se considera un gen supresor de tumores.

PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern, se les llama a distintas estructuras moleculares que pueden ser expresadas por diferentes agentes infecciosos (por ejemplo, el lipopolisacárido de algunas bacterias) y son reconocidos por el sistema inmune innato.

pRB: Proteína retinoblastoma. Proteína reguladora de la transcripción. Al igual que p53 es un importante supresor de tumores, encargándose de detener la progresión del ciclo celular. Inhibe el factor de transcripción E2F

PUMA: p53-Upregulated Modulator of Apoptosis, es una proteína proapoptótica BH3 only de la familia Bcl-2.

ROS: Reactive Oxygen Species, especies reactivas del oxígeno, de diferente naturaleza química (OH^{\bullet} radical hidroxilo, $O_2^{\bullet -}$ ion superóxido, H_2O_2 peróxido de hidrógeno, etc). Se caracterizan por ser oxidantes fuertes pudiendo causar daño oxidativo tanto en lípidos como en proteínas celulares.

SMAC: Second Mitochondrial Activator of Caspase (también llamada Diablo), se conoce con este nombre por ser liberada junto con el citocromo c luego de la permeabilización de la mitocondria. Se une a XIAP promoviendo su degradación.

TNFα: Tumoral Necrosis Factor alfa, citoquina liberada durante la respuesta inflamatoria.

XIAP: X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein, proteína inhibidora de la apoptosis. Perteneciente a la familia IAP, se une a la caspasa 9 en sus diferentes formas (C9, C9*, A*C9, A*C9*) y a la caspasa 3 activa (C3*) promoviendo su degradación.

7.4) Materiales utilizados

Para todas las simulaciones realizadas en el transcurso de esta tesis se utilizó el software Wolfram Mathematica 10. El equipo utilizado fue un computador Intel(R) Core (TM) i7-4770K CPU @ 3.50 GHz, 16 GB de memoria RAM.

7.5) Scripts representativos

DIAGRAMAS DE BIFURCACIÓN

```
Clear["Global`*"]

SetDirectory["D:\\Google Drive\\Programas en ejecución"]
(*Parameters*)

t1=SessionTime[];

k1=2/1000 ; k1r=1/10; k2=5/1000000 ; ; k3=35/100000; k4=2/10000; k5=2/10000;
k6=5/100000; k7=35/10000; k8=2/1000; k8r=1/10; k9=1/1000; k9r=1/1000;
k10=1/1000; k10r=1/1000; k11=1/1000; k11r=1/1000; k12=1/1000; k12r=1/1000;
k13=2/1000; k13r=1/10; k14=2/1000; k14r=1/10; k15=3/1000; k15r=1/1000;
k16=1/1000; k16r=2/100; k17=1/1000; k17r=2/100; k18=1/1000; k18r=4/100;
k19=1/1000; k20=1/1000; k21=1/1000; k22=1/1000; k22r=2/10; k23=1/1000;
k24=1/1000; k25=1/1000; k26=1/1000; k27=1/1000; k28=1/1000;

v1=k1 (Aatot-AaC9-AaC9X-AaC9a-AaC9aX) C9- (k1r AaC9);
v2=k2 C3 C9;
v3=k3 C3 AaC9;
v4=k4 C9 C3a;
v5=k5 AaC9 C3a;
v6=k6 C3 C9a;
v7=k7 C3 AaC9a;
v8=k8 C9a (Aatot-AaC9-AaC9X-AaC9a-AaC9aX) - (k8r AaC9a);
v9=k9 C9 X- (k9r C9X);
v10=k10 AaC9 X- (k10r AaC9X);
v11=k11 C9a X- (k11r C9aX);
v12=k12 AaC9a X- (k12r AaC9aX);
v13=k13 C9X (Aatot-AaC9-AaC9X-AaC9a-AaC9aX) - (k13r AaC9X);
v14=k14 C9aX (Aatot-AaC9-AaC9X-AaC9a-AaC9aX) - (k14r AaC9aX);
v15=k15 C3a X- (k15r C3aX);
v16=0;
v17=k17r-k17 C9;
v18=k18r-k18 X;
v19=k19 C9X;
v20=k20 AaC9X;
v21=k21 AaC9;
v22=k22r- (k22 C3);
v23=k23 C3a;
v24=k24 C3aX;
v25=k25 C9aX;
v26=k26 C9a;
v27=k27 AaC9a;
v28=k28 AaC9aX;

(*Eq1=Aa=-v1-v13-v8-v14+v16;*)
(*C9*) Eq1=-v1-v9-v4+v17;
(*X*) Eq2=-v9-v10-v15-v11-v12+v18;
(*C3*) Eq3=-v2-v3-v6-v7+v22;
(*C9X*) Eq4=v9-v13-v19;
```

(*AaC9X*) Eq5=v10+v13-v20;
 (*AaC9*) Eq6=v1-v10-v5-v21;
 (*C3a*) Eq7=v2+v3-v15+v6+v7-v23;
 (*C3aX*) Eq8=v15-v24;
 (*C9aX*) Eq9=v11-v14-v25;
 (*C9a*) Eq10=v4-v8-v11-v26;
 (*AaC9a*) Eq11=v5+v8-v12-v27;
 (*AaC9aX*) Eq12=v12+v14-v28;

dEq1dC9=D[Eq1,C9];
 dEq1dX=D[Eq1,X];
 dEq1dC3=D[Eq1,C3];
 dEq1dC9X=D[Eq1,C9X];
 dEq1dAaC9X=D[Eq1,AaC9X];
 dEq1dAaC9=D[Eq1,AaC9];
 dEq1dC3a=D[Eq1,C3a];
 dEq1dC3aX=D[Eq1,C3aX];
 dEq1dC9aX=D[Eq1,C9aX];
 dEq1dC9a=D[Eq1,C9a];
 dEq1dAaC9a=D[Eq1,AaC9a];
 dEq1dAaC9aX=D[Eq1,AaC9aX];

dEq2dC9=D[Eq2,C9];
 dEq2dX=D[Eq2,X];
 dEq2dC3=D[Eq2,C3];
 dEq2dC9X=D[Eq2,C9X];
 dEq2dAaC9X=D[Eq2,AaC9X];
 dEq2dAaC9=D[Eq2,AaC9];
 dEq2dC3a=D[Eq2,C3a];
 dEq2dC3aX=D[Eq2,C3aX];
 dEq2dC9aX=D[Eq2,C9aX];
 dEq2dC9a=D[Eq2,C9a];
 dEq2dAaC9a=D[Eq2,AaC9a];
 dEq2dAaC9aX=D[Eq2,AaC9aX];

dEq3dC9=D[Eq3,C9];
 dEq3dX=D[Eq3,X];
 dEq3dC3=D[Eq3,C3];
 dEq3dC9X=D[Eq3,C9X];
 dEq3dAaC9X=D[Eq3,AaC9X];
 dEq3dAaC9=D[Eq3,AaC9];
 dEq3dC3a=D[Eq3,C3a];
 dEq3dC3aX=D[Eq3,C3aX];
 dEq3dC9aX=D[Eq3,C9aX];
 dEq3dC9a=D[Eq3,C9a];
 dEq3dAaC9a=D[Eq3,AaC9a];
 dEq3dAaC9aX=D[Eq3,AaC9aX];

dEq4dC9=D[Eq4,C9];
 dEq4dX=D[Eq4,X];
 dEq4dC3=D[Eq4,C3];
 dEq4dC9X=D[Eq4,C9X];
 dEq4dAaC9X=D[Eq4,AaC9X];
 dEq4dAaC9=D[Eq4,AaC9];
 dEq4dC3a=D[Eq4,C3a];
 dEq4dC3aX=D[Eq4,C3aX];
 dEq4dC9aX=D[Eq4,C9aX];
 dEq4dC9a=D[Eq4,C9a];
 dEq4dAaC9a=D[Eq4,AaC9a];
 dEq4dAaC9aX=D[Eq4,AaC9aX];

dEq5dC9=D[Eq5,C9];
 dEq5dX=D[Eq5,X];
 dEq5dC3=D[Eq5,C3];

dEq5dC9X=D[Eq5,C9X];
dEq5dAaC9X=D[Eq5,AaC9X];
dEq5dAaC9=D[Eq5,AaC9];
dEq5dC3a=D[Eq5,C3a];
dEq5dC3aX=D[Eq1,C3aX];
dEq5dC9aX=D[Eq5,C9aX];
dEq5dC9a=D[Eq5,C9a];
dEq5dAaC9a=D[Eq5,AaC9a];
dEq5dAaC9aX=D[Eq5,AaC9aX];

dEq6dC9=D[Eq6,C9];
dEq6dX=D[Eq6,X];
dEq6dC3=D[Eq6,C3];
dEq6dC9X=D[Eq6,C9X];
dEq6dAaC9X=D[Eq6,AaC9X];
dEq6dAaC9=D[Eq6,AaC9];
dEq6dC3a=D[Eq6,C3a];
dEq6dC3aX=D[Eq6,C3aX];
dEq6dC9aX=D[Eq6,C9aX];
dEq6dC9a=D[Eq6,C9a];
dEq6dAaC9a=D[Eq6,AaC9a];
dEq6dAaC9aX=D[Eq6,AaC9aX];

dEq7dC9=D[Eq7,C9];
dEq7dX=D[Eq7,X];
dEq7dC3=D[Eq7,C3];
dEq7dC9X=D[Eq7,C9X];
dEq7dAaC9X=D[Eq7,AaC9X];
dEq7dAaC9=D[Eq7,AaC9];
dEq7dC3a=D[Eq7,C3a];
dEq7dC3aX=D[Eq7,C3aX];
dEq7dC9aX=D[Eq7,C9aX];
dEq7dC9a=D[Eq7,C9a];
dEq7dAaC9a=D[Eq7,AaC9a];
dEq7dAaC9aX=D[Eq7,AaC9aX];

dEq8dC9=D[Eq8,C9];
dEq8dX=D[Eq8,X];
dEq8dC3=D[Eq8,C3];
dEq8dC9X=D[Eq8,C9X];
dEq8dAaC9X=D[Eq8,AaC9X];
dEq8dAaC9=D[Eq8,AaC9];
dEq8dC3a=D[Eq8,C3a];
dEq8dC3aX=D[Eq8,C3aX];
dEq8dC9aX=D[Eq8,C9aX];
dEq8dC9a=D[Eq8,C9a];
dEq8dAaC9a=D[Eq8,AaC9a];
dEq8dAaC9aX=D[Eq8,AaC9aX];

dEq9dC9=D[Eq9,C9];
dEq9dX=D[Eq9,X];
dEq9dC3=D[Eq9,C3];
dEq9dC9X=D[Eq9,C9X];
dEq9dAaC9X=D[Eq9,AaC9X];
dEq9dAaC9=D[Eq9,AaC9];
dEq9dC3a=D[Eq9,C3a];
dEq9dC3aX=D[Eq9,C3aX];
dEq9dC9aX=D[Eq9,C9aX];
dEq9dC9a=D[Eq9,C9a];
dEq9dAaC9a=D[Eq9,AaC9a];
dEq9dAaC9aX=D[Eq9,AaC9aX];

dEq10dC9=D[Eq10,C9];
dEq10dX=D[Eq10,X];

```

dEq10dC3=D[Eq10,C3];
dEq10dC9X=D[Eq10,C9X];
dEq10dAaC9X=D[Eq10,AaC9X];
dEq10dAaC9=D[Eq10,AaC9];
dEq10dC3a=D[Eq10,C3a];
dEq10dC3aX=D[Eq10,C3aX];
dEq10dC9aX=D[Eq10,C9aX];
dEq10dC9a=D[Eq10,C9a];
dEq10dAaC9a=D[Eq10,AaC9a];
dEq10dAaC9aX=D[Eq10,AaC9aX];

dEq11dC9=D[Eq11,C9];
dEq11dX=D[Eq11,X];
dEq11dC3=D[Eq11,C3];
dEq11dC9X=D[Eq11,C9X];
dEq11dAaC9X=D[Eq11,AaC9X];
dEq11dAaC9=D[Eq11,AaC9];
dEq11dC3a=D[Eq11,C3a];
dEq11dC3aX=D[Eq11,C3aX];
dEq11dC9aX=D[Eq11,C9aX];
dEq11dC9a=D[Eq11,C9a];
dEq11dAaC9a=D[Eq11,AaC9a];
dEq11dAaC9aX=D[Eq11,AaC9aX];

dEq12dC9=D[Eq12,C9];
dEq12dX=D[Eq12,X];
dEq12dC3=D[Eq12,C3];
dEq12dC9X=D[Eq12,C9X];
dEq12dAaC9X=D[Eq12,AaC9X];
dEq12dAaC9=D[Eq12,AaC9];
dEq12dC3a=D[Eq12,C3a];
dEq12dC3aX=D[Eq12,C3aX];
dEq12dC9aX=D[Eq12,C9aX];
dEq12dC9a=D[Eq12,C9a];
dEq12dAaC9a=D[Eq12,AaC9a];
dEq12dAaC9aX=D[Eq12,AaC9aX];

graCss={};

Do[Clear[solss,C9ss,C3ss,Xss,C9Xss,AaC9Xss,AaC9ss,C3aXss,C9aXss,C9ass,AaC9ass,
AaC9aXss,C3ass,lss];solss=NSolve[{Eq1==0,Eq2==0,Eq3==0,Eq4==0,Eq5==0,Eq6==0,
Eq7==0,Eq8==0,Eq9==0,Eq10==0,Eq11==0,Eq12==0},{C9,C3,X,C9X,AaC9X,AaC9,C3aX,C9
aX,C9a,AaC9a,AaC9aX,C3a},Reals,WorkingPrecision->500];
C9ss=C9/.solss;
C3ss=C3/.solss;
Xss=X/.solss;
C9Xss=C9X/.solss;
AaC9Xss=AaC9X/.solss;
AaC9ss=AaC9/.solss;
C3ass=C3a/.solss;
C3aXss=C3aX/.solss;
C9aXss=C9aX/.solss;
C9ass=C9a/.solss;
AaC9ass=AaC9a/.solss;
AaC9aXss=AaC9aX/.solss; lss=Length[solss];

Do[vector={C9ss[[i]],C3ss[[i]],Xss[[i]],C9Xss[[i]],AaC9Xss[[i]],AaC9ss[[i]],C
3ass[[i]],C3aXss[[i]],C9aXss[[i]],C9ass[[i]],AaC9ass[[i]],AaC9aXss[[i]]};If[M
in[Re[vector]]>= 0,

AppendTo[graCss,{Aatot,Re[C9ss[[i]],Re[Xss[[i]],Re[C3ss[[i]],Re[C9Xss[[i]]
],Re[AaC9Xss[[i]],Re[AaC9ss[[i]],Re[C3ass[[i]],Re[C3aXss[[i]],Re[C9aXss[[
i]],Re[C9ass[[i]],Re[AaC9ass[[i]],Re[AaC9aXss[[i]]]}],{i,1,lss}}];Print["A
atot=",Aatot],{Aatot,0,10,1/10}];

```

```

lCss=Length[graCss];

graestC9={};grainestC9={};
graestX={};grainestX={};
graestC3={};grainestC3={};
graestC9X={};grainestC9X={};
graestAaC9X={}; grainestAaC9X={};
graestAaC9={}; grainestAaC9={};
graestC3a={}; grainestC3a={};
graestC3aX={}; grainestC3aX={};
graestC9aX={};grainestC9aX={};
graestC9a={}; grainestC9a={};
graestAaC9a={};grainestAaC9a={};
graestAaC9aX={};grainestAaC9aX={};

VPss={};

Do[Clear[Aatot,C9,X,C3,C9X,AaC9X,AaC9,C3a,C3aX,C9aX,C9a,AaC9a,AaC9aX,JJ];
  Aatot=graCss[[i,1]];
  C9=graCss[[i,2]];
  X=graCss[[i,3]];
  C3=graCss[[i,4]];
  C9X=graCss[[i,5]];
  AaC9X=graCss[[i,6]];
  AaC9=graCss[[i,7]];
  C3a=graCss[[i,8]];
  C3aX=graCss[[i,9]];
  C9aX=graCss[[i,10]];
  C9a=graCss[[i,11]];
  AaC9a=graCss[[i,12]];
  AaC9aX=graCss[[i,13]];

JJ={{dEq1dC9,dEq1dX,dEq1dC3,dEq1dC9X,dEq1dAaC9X,dEq1dAaC9,dEq1dC3a,dEq1dC3aX,
dEq1dC9aX,dEq1dC9a,dEq1dAaC9a,dEq1dAaC9aX},

{dEq2dC9,dEq2dX,dEq2dC3,dEq2dC9X,dEq2dAaC9X,dEq2dAaC9,dEq2dC3a,dEq2dC3aX,dEq2
dC9aX,dEq2dC9a,dEq2dAaC9a,dEq2dAaC9aX},

{dEq3dC9,dEq3dX,dEq3dC3,dEq3dC9X,dEq3dAaC9X,dEq3dAaC9,dEq3dC3a,dEq3dC3aX,dEq3
dC9aX,dEq3dC9a,dEq3dAaC9a,dEq3dAaC9aX},

{dEq4dC9,dEq4dX,dEq4dC3,dEq4dC9X,dEq4dAaC9X,dEq4dAaC9,dEq4dC3a,dEq4dC3aX,dEq4
dC9aX,dEq4dC9a,dEq4dAaC9a,dEq4dAaC9aX},

{dEq5dC9,dEq5dX,dEq5dC3,dEq5dC9X,dEq5dAaC9X,dEq5dAaC9,dEq5dC3a,dEq5dC3aX,dEq5
dC9aX,dEq5dC9a,dEq5dAaC9a,dEq5dAaC9aX},

{dEq6dC9,dEq6dX,dEq6dC3,dEq6dC9X,dEq6dAaC9X,dEq6dAaC9,dEq6dC3a,dEq6dC3aX,dEq6
dC9aX,dEq6dC9a,dEq6dAaC9a,dEq6dAaC9aX},

{dEq7dC9,dEq7dX,dEq7dC3,dEq7dC9X,dEq7dAaC9X,dEq7dAaC9,dEq7dC3a,dEq7dC3aX,dEq7
dC9aX,dEq7dC9a,dEq7dAaC9a,dEq7dAaC9aX},

{dEq8dC9,dEq8dX,dEq8dC3,dEq8dC9X,dEq8dAaC9X,dEq8dAaC9,dEq8dC3a,dEq8dC3aX,dEq8
dC9aX,dEq8dC9a,dEq8dAaC9a,dEq8dAaC9aX},

{dEq9dC9,dEq9dX,dEq9dC3,dEq9dC9X,dEq9dAaC9X,dEq9dAaC9,dEq9dC3a,dEq9dC3aX,dEq9
dC9aX,dEq9dC9a,dEq9dAaC9a,dEq9dAaC9aX},

{dEq10dC9,dEq10dX,dEq10dC3,dEq10dC9X,dEq10dAaC9X,dEq10dAaC9,dEq10dC3a,dEq10dC
3aX,dEq10dC9aX,dEq10dC9a,dEq10dAaC9a,dEq10dAaC9aX},

```

```

{dEq11dC9, dEq11dX, dEq11dC3, dEq11dC9X, dEq11dAaC9X, dEq11dAaC9, dEq11dC3a, dEq11dC
3aX, dEq11dC9aX, dEq11dC9a, dEq11dAaC9a, dEq11dAaC9aX},

{dEq12dC9, dEq12dX, dEq12dC3, dEq12dC9X, dEq12dAaC9X, dEq12dAaC9, dEq12dC3a, dEq12dC
3aX, dEq12dC9aX, dEq12dC9a, dEq12dAaC9a, dEq12dAaC9aX}};
VP=Eigenvalues[N[JJ, 50]];
AppendTo[VPss, {Aatot, C3a, Max[Re[VP]]}];
If[(Max[Re[VP]]<0),
AppendTo[graestC9, {Aatot, C9}];
AppendTo[graestX, {Aatot, X}];
AppendTo[graestC3, {Aatot, C3}];
AppendTo[graestC9X, {Aatot, C9X}];
AppendTo[graestAaC9X, {Aatot, AaC9X}];
AppendTo[graestAaC9, {Aatot, AaC9}];
AppendTo[graestC3a, {Aatot, C3a}];
AppendTo[graestC3aX, {Aatot, C3aX}];
AppendTo[graestC9aX, {Aatot, C9aX}];
AppendTo[graestC9a, {Aatot, C9a}];
AppendTo[graestAaC9a, {Aatot, AaC9a}];
AppendTo[graestAaC9aX, {Aatot, AaC9aX}],
AppendTo[grainestC9, {Aatot, C9}];
AppendTo[grainestX, {Aatot, X}];
AppendTo[grainestC3, {Aatot, C3}];
AppendTo[grainestC9X, {Aatot, C9X}];
AppendTo[grainestAaC9X, {Aatot, AaC9X}];
AppendTo[grainestAaC9, {Aatot, AaC9}];
AppendTo[grainestC3a, {Aatot, C3a}];
AppendTo[grainestC3aX, {Aatot, C3aX}];
AppendTo[grainestC9aX, {Aatot, C9aX}];
AppendTo[grainestC9a, {Aatot, C9a}];
AppendTo[grainestAaC9a, {Aatot, AaC9a}];
AppendTo[grainestAaC9aX, {Aatot, AaC9aX}]], {i, 1, lC9s}];

LPestC9=ListPlot[graestC9, PlotStyle->Black];
LPestX=ListPlot[graestX, PlotStyle->Black];
LPestC3=ListPlot[graestC3, PlotStyle->Black];
LPestC9X=ListPlot[graestC9X, PlotStyle->Black];
LPestAaC9X=ListPlot[graestAaC9X, PlotStyle->Black];
LPestAaC9=ListPlot[graestAaC9, PlotStyle->Black];
LPestC3a=ListPlot[graestC3a, PlotStyle->Black];
LPestC3aX=ListPlot[graestC3aX, PlotStyle->Black];
LPestC9aX=ListPlot[graestC9aX, PlotStyle->Black];
LPestC9a=ListPlot[graestC9a, PlotStyle->Black];
LPestAaC9a=ListPlot[graestAaC9a, PlotStyle->Black];
LPestAaC9aX=ListPlot[graestAaC9aX, PlotStyle->Black];

LPinestC9=ListPlot[grainestC9, PlotStyle->Red, PlotMarkers->0];
LPinestX=ListPlot[grainestX, PlotStyle->Red, PlotMarkers->0];
LPinestC3=ListPlot[grainestC3, PlotStyle->Red, PlotMarkers->0];
LPinestC9X=ListPlot[grainestC9X, PlotStyle->Red, PlotMarkers->0];
LPinestAaC9X=ListPlot[grainestAaC9X, PlotStyle->Red, PlotMarkers->0];
LPinestAaC9=ListPlot[grainestAaC9, PlotStyle->Red, PlotMarkers->0];
LPinestC3a=ListPlot[grainestC3a, PlotStyle->Red, PlotMarkers->0];
LPinestC3aX=ListPlot[grainestC3aX, PlotStyle->Red, PlotMarkers->0];
LPinestC9aX=ListPlot[grainestC9aX, PlotStyle->Red, PlotMarkers->0];
LPinestC9a=ListPlot[grainestC9a, PlotStyle->Red, PlotMarkers->0];
LPinestAaC9a=ListPlot[grainestAaC9a, PlotStyle->Red, PlotMarkers->0];
LPinestAaC9aX=ListPlot[grainestAaC9aX, PlotStyle->Red, PlotMarkers->0];

Leg1=Show[LPestC9, LPinestC9, PlotRange->All, Frame->True, BaseStyle->{FontSize-
>14}, PlotLabel->"Steady state behaviour", FrameLabel-
>{"Aatot", "C9"}, AspectRatio->1]

```

```

Leg2=Show[LPestX,LPinestX,PlotRange->All,Frame->True,BaseStyle->{FontSize->14},PlotLabel->"Steady state behaviour",FrameLabel->{"Aatot","X"},AspectRatio->1]
Leg3=Show[LPestC3,LPinestC3,PlotRange->All,Frame->True,BaseStyle->{FontSize->14},PlotLabel->"Steady state behaviour",FrameLabel->{"Aatot","C3"},AspectRatio->1]
Leg4=Show[LPestC9X,LPinestC9X,PlotRange->All,Frame->True,BaseStyle->{FontSize->14},PlotLabel->"Steady state behaviour",FrameLabel->{"Aatot","C9X"},AspectRatio->1]
Leg5=Show[LPestAaC9X,LPinestAaC9X,PlotRange->All,Frame->True,BaseStyle->{FontSize->14},PlotLabel->"Steady state behaviour",FrameLabel->{"Aatot","AaC9X"},AspectRatio->1]
Leg6=Show[LPestAaC9,LPinestAaC9,PlotRange->All,Frame->True,BaseStyle->{FontSize->14},PlotLabel->"Steady state behaviour",FrameLabel->{"Aatot","AaC9"},AspectRatio->1]
Leg7=Show[LPestC3a,LPinestC3a,PlotRange->All,Frame->True,BaseStyle->{FontSize->14},PlotLabel->"Steady state behaviour",FrameLabel->{"Aatot","C3a"},AspectRatio->1]
Leg8=Show[LPestC3aX,LPinestC3aX,PlotRange->All,Frame->True,BaseStyle->{FontSize->14},PlotLabel->"Steady state behaviour",FrameLabel->{"Aatot","C3aX"},AspectRatio->1]
Leg9=Show[LPestC9aX,LPinestC9aX,PlotRange->All,Frame->True,BaseStyle->{FontSize->14},PlotLabel->"Steady state behaviour",FrameLabel->{"Aatot","C9aX"},AspectRatio->1]
Leg10=Show[LPestC9a,LPinestC9a,PlotRange->All,Frame->True,BaseStyle->{FontSize->14},PlotLabel->"Steady state behaviour",FrameLabel->{"Aatot","C9a"},AspectRatio->1]
Leg11=Show[LPestAaC9a,LPinestAaC9a,PlotRange->All,Frame->True,BaseStyle->{FontSize->14},PlotLabel->"Steady state behaviour",FrameLabel->{"Aatot","AaC9a"},AspectRatio->1]
Leg12=Show[LPestAaC9aX,LPinestAaC9aX,PlotRange->All,Frame->True,BaseStyle->{FontSize->14},PlotLabel->"Steady state behaviour",FrameLabel->{"Aatot","AaC9aX"},AspectRatio->1]

```

CURSOS TEMPORALES

```
Clear["Global`*"]
```

```
(*Parameters*)
```

```

k1=2*60*10^-3; k1r=0.1*60; k2=5*60*10^-6; ; k3=3.5*60*10^-4; k4=2*60*10^-4;
k5=2*60*10^-4; k6=5*60*10^-5; k7=3.5*60*10^-3; k8=2*60*10^-3; k8r=0.1*60;
k9=1*60*10^-3; k9r=1*60*10^-3; k10=1*60*10^-3; k10r=1*60*10^-3; k11=1*60*10^-3;
k11r=1*60*10^-3; k12=1*60*10^-3; k12r=1*60*10^-3; k13=2*60*10^-3;
k13r=0.1*60; k14=2*60*10^-3 ; k14r=0.1*60; k15=3*60*10^-3; k15r=1*60*10^-3;
k16=1*60*10^-3; k16r=0.02*60; k17=1*60*10^-3; k17r=0.02*60; k18=1*60*10^-3;
k18r=0.04*60; k19=1*60*10^-3; k20=1*60*10^-3; k21=1*60*10^-3; k22=1*60*10^-3;
k22r=0.2*60; k23=1*60*10^-3; k24=1*60*10^-3; k25=1*60*10^-3; k26=1*60*10^-3;
k27=1*60*10^-3; k28=1*60*10^-3;

```

```
(*Unidades:nM; min*)
```

```
v1=k1 (Aatot-AaC9[t]-AaC9X[t]-AaC9a[t]-AaC9aX[t])C9[t]-(k1r AaC9[t]);
```

```
v2=k2 C3[t]C9[t];
```

```
v3=k3 C3[t]AaC9[t];
```

```
v4=k4 C9[t]C3a[t];
```

$v5=k5 \text{ AaC9}[t] \text{ C3a}[t];$
 $v6=k6 \text{ C3}[t] \text{ C9a}[t];$
 $v7=k7 \text{ C3}[t] \text{ AaC9a}[t];$
 $v8=k8 \text{ C9a}[t] (\text{Aatot}-\text{AaC9}[t]-\text{AaC9X}[t]-\text{AaC9a}[t]-\text{AaC9aX}[t])-(k8r \text{ AaC9a}[t]);$
 $v9=k9 \text{ C9}[t]X[t]-(k9r \text{ C9X}[t]);$
 $v10=k10 \text{ AaC9}[t] X[t]-(k10r \text{ AaC9X}[t]);$
 $v11=k11 \text{ C9a}[t] X[t]-(k11r \text{ C9aX}[t]);$
 $v12=k12 \text{ AaC9a}[t] X[t]-(k12r \text{ AaC9aX}[t]);$
 $v13=k13 \text{ C9X}[t] (\text{Aatot}-\text{AaC9}[t]-\text{AaC9X}[t]-\text{AaC9a}[t]-\text{AaC9aX}[t])-(k13r \text{ AaC9X}[t]);$
 $v14=k14 \text{ C9aX}[t] (\text{Aatot}-\text{AaC9}[t]-\text{AaC9X}[t]-\text{AaC9a}[t]-\text{AaC9aX}[t])-(k14r \text{ AaC9aX}[t]);$
 $v15=k15 \text{ C3a}[t] X[t]-(k15r \text{ C3aX}[t]);$
 $v16=0;$
 $v17=k17r-k17 \text{ C9}[t];$
 $v18=k18r-k18 X[t];$
 $v19=k19 \text{ C9X}[t];$
 $v20=k20 \text{ AaC9X}[t];$
 $v21=k21 \text{ AaC9}[t];$
 $v22=k22r-(k22 \text{ C3}[t]);$
 $v23=k23 \text{ C3a}[t];$
 $v24=k24 \text{ C3aX}[t];$
 $v25=k25 \text{ C9aX}[t];$
 $v26=k26 \text{ C9a}[t];$
 $v27=k27 \text{ AaC9a}[t];$
 $v28=k28 \text{ AaC9aX}[t];$

(*Eq1=Aa'[t]==-v1-v13-v8+v16;*)

Eq1=C9'[t]==-v1-v9-v4+v17;

Eq2=X'[t]==-v9-v10-v15-v11-v12+v18;

Eq3=C3'[t]==-v2-v3-v6-v7+v22;

Eq4=C9X'[t]==v9-v13-v19;

Eq5=AaC9X'[t]==v10+v13-v20;

Eq6=AaC9'[t]==v1-v10-v5-v21;


```
Eq7=C3a'[t]==v2+v3-v15+v6+v7-v23;
```

```
Eq8=C3aX'[t]==v15-v24;
```

```
Eq9=C9aX'[t]==v11-v14-v25;
```

```
Eq10=C9a'[t]==v4-v8-v11-v26;
```

```
Eq11=AaC9a'[t]==v5+v8-v12-v27;
```

```
Eq12=AaC9aX'[t]==v12+v14-v28;
```

```
Aatot=20;
```

```
graC9={};
```

```
graX={};
```

```
graC3={};
```

```
graC9X={};
```

```
graAaC9X={};
```

```
graAaC9={};
```

```
graC3a={};
```

```
graC3aX={};
```

```
graC9aX={};
```

```
graC9a={};
```

```
graAaC9a={};
```

```
graAaC9aX={};
```

```
tf=80;
```

```
Block[{C3a0=C3a0},Do[
```

```
Clear[sol,C9,C3,X,C9X,AaC9X,AaC9,C3aX,C9aX,C9a,AaC9a,AaC9aX,C3a];sol=NDSolve[  
{Eq1,Eq2,Eq3,Eq4,Eq5,Eq6,Eq7,Eq8,Eq9,Eq10,Eq11,Eq12,C9X[0]==0,C9[0]==20,C3[0]  
==200,X[0]==40,AaC9X[0]==0,AaC9[0]==0,C3aX[0]==0,C9aX[0]==0,C9a[0]==0,AaC9a[0]  
]==0,AaC9aX[0]==0,C3a[0]==C3a0},{C9[t],X[t],C3[t],C9X[t],AaC9X[t],AaC9[t],C3a  
X[t],C9aX[t],C9a[t],AaC9a[t],AaC9aX[t],C3a[t]},{t,0,tf},MaxSteps->5000000];
```

```
C9[t_]=C9[t]/.sol;
```

```
X[t_]=X[t]/.sol;
```

```
C3[t_]= C3[t]/.sol;
```

```
C9X[t_]=C9X[t]/.sol;
```

```
AaC9X[t_]=AaC9X[t]/.sol;
```

```
AaC9[t_]=AaC9[t]/.sol;
```

```
C3a[t_] =C3a[t] /. sol;
```

```

C3aX[t_] =C3aX[t] /. sol;

C9aX[t_] =C9aX[t] /. sol;

C9a[t_] =C9a[t] /. sol;

AaC9a[t_] =AaC9a[t] /. sol;

AaC9aX[t_] =AaC9aX[t] /. sol;

AppendTo[graC9, Plot[C9[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Black}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graX, Plot[X[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Black}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC3, Plot[C3[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Black}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC9X, Plot[C9X[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Black}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC9X, Plot[AaC9X[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Black}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC9, Plot[AaC9[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Black}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC3a, Plot[C3a[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Black}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC3aX, Plot[C3aX[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Black}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC9aX, Plot[C9aX[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Black}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC9a, Plot[C9a[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Black}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC9a, Plot[AaC9a[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Black}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC9aX, Plot[AaC9aX[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Black}, DisplayFunction->Identity]], {C3a0, 0, 0, 1}]];

Aatot=10;

graC91={};

graX1={};

graC31={};

graC9X1={};

graAaC9X1={};

graAaC91={};

```

```

graC3a1={};

graC3aX1={};

graC9aX1={};

graC9a1={};

graAaC9a1={};

graAaC9aX1={};

tf=80;

Block[{C3a0=C3a0}, Do[
Clear[sol, C9, C3, X, C9X, AaC9X, AaC9, C3aX, C9aX, C9a, AaC9a, AaC9aX, C3a]; sol=NDSolve[
{Eq1, Eq2, Eq3, Eq4, Eq5, Eq6, Eq7, Eq8, Eq9, Eq10, Eq11, Eq12, C9X[0]==0, C9[0]==20, C3[0]
==200, X[0]==40, AaC9X[0]==0, AaC9[0]==0, C3aX[0]==0, C9aX[0]==0, C9a[0]==0, AaC9a[0]
]==0, AaC9aX[0]==0, C3a[0]==C3a0}, {C9[t], X[t], C3[t], C9X[t], AaC9X[t], AaC9[t], C3a
X[t], C9aX[t], C9a[t], AaC9a[t], AaC9aX[t], C3a[t]}, {t, 0, tf}, MaxSteps->5000000];

C9[t_]=C9[t]/.sol;

X[t_]=X[t]/.sol;

C3[t_]= C3[t]/.sol;

C9X[t_]=C9X[t]/.sol;

AaC9X[t_]=AaC9X[t]/.sol;

AaC9[t_]=AaC9[t]/.sol;

C3a[t_] =C3a[t] /. sol;

C3aX[t_] =C3aX[t] /. sol;

C9aX[t_]=C9aX[t]/.sol;

C9a[t_]=C9a[t]/.sol;

AaC9a[t_]=AaC9a[t]/.sol;

AaC9aX[t_]=AaC9aX[t]/.sol;

AppendTo[graC91, Plot[C9[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Red}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graX1, Plot[X[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Red}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC31, Plot[C3[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Red}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC9X1, Plot[C9X[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Red}, DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC9X1, Plot[AaC9X[t], {t, 0, tf}, PlotRange->All, PlotStyle-
>{Thickness[0.005], Red}, DisplayFunction->Identity]];

```

```

AppendTo[graAaC91,Plot[AaC9[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle->{Thickness[0.005],Red},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC3a1,Plot[C3a[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle->{Thickness[0.005],Red},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC3aX1,Plot[C3aX[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle->{Thickness[0.005],Red},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC9aX1,Plot[C9aX[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle->{Thickness[0.005],Red},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC9a1,Plot[C9a[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle->{Thickness[0.005],Red},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC9a1,Plot[AaC9a[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle->{Thickness[0.005],Red},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC9aX1,Plot[AaC9aX[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle->{Thickness[0.005],Red},DisplayFunction->Identity]],{C3a0,0,0,1}]];

```

```
Aatot=6.5;
```

```
graC92={};
```

```
graX2={};
```

```
graC32={};
```

```
graC9X2={};
```

```
graAaC9X2={};
```

```
graAaC92={};
```

```
graC3a2={};
```

```
graC3aX2={};
```

```
graC9aX2={};
```

```
graC9a2={};
```

```
graAaC9a2={};
```

```
graAaC9aX2={};
```

```
tf=80;
```

```

Block[{C3a0=C3a0},Do[
Clear[sol,C9,C3,X,C9X,AaC9X,AaC9,C3aX,C9aX,C9a,AaC9a,AaC9aX,C3a];sol=NDSolve[
{Eq1,Eq2,Eq3,Eq4,Eq5,Eq6,Eq7,Eq8,Eq9,Eq10,Eq11,Eq12,C9X[0]==0,C9[0]==20,C3[0]
==200,X[0]==40,AaC9X[0]==0,AaC9[0]==0,C3aX[0]==0,C9aX[0]==0,C9a[0]==0,AaC9a[0]
]==0,AaC9aX[0]==0,C3a[0]==C3a0},{C9[t],X[t],C3[t],C9X[t],AaC9X[t],AaC9[t],C3a
X[t],C9aX[t],C9a[t],AaC9a[t],AaC9aX[t],C3a[t]},{t,0,tf},MaxSteps->5000000];

```

```
C9[t_]=C9[t]/.sol;
```

```
X[t_]=X[t]/.sol;
```

```

C3[t_]= C3[t]/.sol;

C9X[t_]=C9X[t]/.sol;

AaC9X[t_]=AaC9X[t]/.sol;

AaC9[t_]=AaC9[t]/.sol;

C3a[t_] =C3a[t] /. sol;

C3aX[t_] =C3aX[t] /. sol;

C9aX[t_]=C9aX[t]/.sol;

C9a[t_]=C9a[t]/.sol;

AaC9a[t_]=AaC9a[t]/.sol;

AaC9aX[t_]=AaC9aX[t]/.sol;

AppendTo[graC92,Plot[C9[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Blue},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graX2,Plot[X[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Blue},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC32,Plot[C3[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Blue},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC9X2,Plot[C9X[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Blue},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC9X2,Plot[AaC9X[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Blue},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC92,Plot[AaC9[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Blue},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC3a2,Plot[C3a[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Blue},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC3aX2,Plot[C3aX[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Blue},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC9aX2,Plot[C9aX[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Blue},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC9a2,Plot[C9a[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Blue},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC9a2,Plot[AaC9a[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Blue},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC9aX2,Plot[AaC9aX[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Blue},DisplayFunction->Identity]],{C3a0,0,0,1}]];

Aatot=5;

graC93={};

```

```

graX3={};
graC33={};
graC9X3={};
graAaC9X3={};
graAaC93={};
graC3a3={};
graC3aX3={};
graC9aX3={};
graC9a3={};
graAaC9a3={};
graAaC9aX3={};

tf=80;

Block[{C3a0=C3a0},Do[
Clear[sol,C9,C3,X,C9X,AaC9X,AaC9,C3aX,C9aX,C9a,AaC9a,AaC9aX,C3a];sol=NDSolve[
{Eq1,Eq2,Eq3,Eq4,Eq5,Eq6,Eq7,Eq8,Eq9,Eq10,Eq11,Eq12,C9X[0]==0,C9[0]==20,C3[0]
==200,X[0]==40,AaC9X[0]==0,AaC9[0]==0,C3aX[0]==0,C9aX[0]==0,C9a[0]==0,AaC9a[0]
]==0,AaC9aX[0]==0,C3a[0]==C3a0},{C9[t],X[t],C3[t],C9X[t],AaC9X[t],AaC9[t],C3a
X[t],C9aX[t],C9a[t],AaC9a[t],AaC9aX[t],C3a[t]},{t,0,tf},MaxSteps->5000000];

C9[t_]=C9[t]/.sol;
X[t_]=X[t]/.sol;
C3[t_]=C3[t]/.sol;
C9X[t_]=C9X[t]/.sol;
AaC9X[t_]=AaC9X[t]/.sol;
AaC9[t_]=AaC9[t]/.sol;
C3a[t_]=C3a[t]/.sol;
C3aX[t_]=C3aX[t]/.sol;
C9aX[t_]=C9aX[t]/.sol;
C9a[t_]=C9a[t]/.sol;
AaC9a[t_]=AaC9a[t]/.sol;
AaC9aX[t_]=AaC9aX[t]/.sol;

AppendTo[graC93,Plot[C9[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Green},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graX3,Plot[X[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Green},DisplayFunction->Identity]];

```

```

AppendTo[graC33,Plot[C3[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Green},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC9X3,Plot[C9X[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Green},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC9X3,Plot[AaC9X[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Green},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC93,Plot[AaC9[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Green},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC3a3,Plot[C3a[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Green},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC3aX3,Plot[C3aX[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Green},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC9aX3,Plot[C9aX[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Green},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graC9a3,Plot[C9a[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Green},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC9a3,Plot[AaC9a[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Green},DisplayFunction->Identity]];

AppendTo[graAaC9aX3,Plot[AaC9aX[t],{t,0,tf},PlotRange->All,PlotStyle-
>{Thickness[0.005],Green},DisplayFunction->Identity]],{C3a0,0,0,1}]];

label1=Graphics[Text["20 nM",{7,100},BaseStyle->{FontSize->14,FontFamily-
>"Times",Bold(*,Italic*)}]];

label2=Graphics[Text["10 nM",{19,85},BaseStyle->{FontSize->14,FontFamily-
>"Times",Bold(*,Italic*)}]];

label3=Graphics[Text["6.5 nM",{37,70},BaseStyle->{FontSize->14,FontFamily-
>"Times",Bold(*,Italic*)}]];

label4=Graphics[Text["5 nM",{58,50},BaseStyle->{FontSize->14,FontFamily-
>"Times",Bold(*,Italic*)}]];

Show[graC9,graC91,graC92,graC93,Frame->True,AspectRatio->1,PlotRange-
>All,AxesOrigin->{0,0},FrameLabel->{"t [min]","Casp9 [nM]"},LabelStyle-
>{FontSize->14}]

Show[graX,graX1,graX2,graX3,Frame->True,AspectRatio->1,PlotRange-
>All,AxesOrigin->{0,0},FrameLabel->{"t [min]","XIAP [nM]"},LabelStyle-
>{FontSize->14}]

Show[graC3,graC31,graC32,graC33,Frame->True,AspectRatio->1,PlotRange-
>All,AxesOrigin->{0,0},FrameLabel->{"t [min]","Casp3 [nM]"},LabelStyle-
>{FontSize->14}]

```

```
Show[graC9X,graC9X1,graC9X2,graC9X3,Frame->True, AspectRatio->1,PlotRange->All,AxesOrigin->{0,0}, FrameLabel->{"t [min]","C9X [nM]"},LabelStyle->{FontSize-> 14}]
```

```
Show[graAaC9X,graAaC9X1,graAaC9X2,graAaC9X3,Frame->True, AspectRatio->1,PlotRange->All,AxesOrigin->{0,0}, FrameLabel->{"t [min]","AaC9X [nM]"},LabelStyle->{FontSize-> 14}]
```

```
Show[graAaC9,graAaC91,graAaC92,graAaC93,Frame->True, AspectRatio->1,PlotRange->All,AxesOrigin->{0,0}, FrameLabel->{"t [min]","AaC9 [nM]"},LabelStyle->{FontSize-> 14}]
```

```
LP=Show[graC3a,graC3a1,graC3a2,graC3a3,label1,label2,label3,label4,Frame->True, AspectRatio->1,PlotRange->{{-1,80},{-5,160}},AxesOrigin->{0,0}, FrameLabel->{"t [min]","Active Casp3 [nM]"},LabelStyle->{FontSize-> 14}]
```

```
Show[graC3aX,graC3aX1,graC3aX2,graC3aX3,Frame->True, AspectRatio->1,PlotRange->All,AxesOrigin->{0,0}, FrameLabel->{"t [min]","C3aX [nM]"},LabelStyle->{FontSize-> 14}]
```

```
Show[graC9aX,graC9aX1,graC9aX2,graC9aX3,Frame->True, AspectRatio->1,PlotRange->All,AxesOrigin->{0,0}, FrameLabel->{"t [min]","C9aX [nM]"},LabelStyle->{FontSize-> 14}]
```

```
Show[graC9a,graC9a1,graC9a2,graC9a3,Frame->True, AspectRatio->1,PlotRange->All,AxesOrigin->{0,0}, FrameLabel->{"t [min]","Active Casp9 [nM]"},LabelStyle->{FontSize-> 14}]
```

```
Show[graAaC9a,graAaC9a1,graAaC9a2,graAaC9a3,Frame->True, AspectRatio->1,PlotRange->All,AxesOrigin->{0,0}, FrameLabel->{"t [min]","AaC9a [nM]"},LabelStyle->{FontSize-> 14}]
```

```
Show[graAaC9aX,graAaC9aX1,graAaC9aX2,graAaC9aX3,Frame->True, AspectRatio->1,PlotRange->All,AxesOrigin->{0,0}, FrameLabel->{"t [min]","AaC9aX [nM]"},LabelStyle->{FontSize-> 14}]
```