



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Bogotá

**RECONSTRUCCIÓN A ESCALA GENÓMICA DE UNA RED METABÓLICA DE
ASTROCITO HUMANO: APLICACIÓN A ISQUEMIA**

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MAGISTER EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

CYNTHIA ALEXANDRA MARTÍN JIMÉNEZ

TUTORA:
JANNETH GONZÁLEZ SANTOS

CO-TUTOR
GEORGE BARRETO

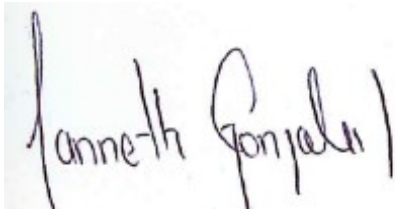
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ, D.C.
2016

ARTÍCULO 23, RESOLUCIÓN 13 DE 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

RECONSTRUCCIÓN A ESCALA GENÓMICA DE UNA RED METABÓLICA DE
ASTROCITO HUMANO: APLICACIÓN A ISQUEMIA

CYNTHIA A. MARTÍN JIMÉNEZ



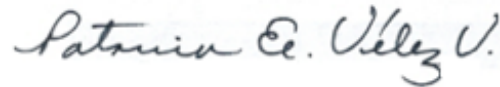
Janneth González Santos, MSc. PhD.
Tutora



George Emilio Barreto Sampaio,
MSc. PhD.
Co-tutor



Luz Mary Salazar Pulido, PhD
Jurado 1



Patricia E. Vélez Varela, MSc. PhD



Orlando E. Acevedo PhD
Jurado 3

**RECONSTRUCCIÓN A ESCALA GENÓMICA DE UNA RED METABÓLICA DE
ASTROCITO HUMANO: APLICACIÓN A ISQUEMIA**

CYNTHIA A. MARTÍN JIMÉNEZ

Alba Alicia Trespalacios, MSc. PhD.
Director posgrado
Facultad de ciencias

Concepción Judith puerta Bula, PhD.
Decana
Facultad de ciencias

AGRADECIMIENTOS

La culminación de este trabajo de grado está dedicada a todos y cada uno de las personas que con sus consejos y aportes la nutrieron, pero muy especialmente a mi tutora Janneth González, al Dc. George Barreto por permitirme trabajar en el grupo, a mi hermano Manuel por su colaboración en el área de sistemas, a mi novio por su paciente espera, a mi Madre por su incondicional apoyo y a mi Padre que desde el cielo nunca me desampara, a todos ellos les quiero decir, gracias.

Tabla de contenido

ABREVIATURAS	10
RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN	13
2. MARCO TEÓRICO	17
2.1 ASTROCITO	17
2.2 ISQUEMIA	20
2.3 IMPLICACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN PATOLOGÍAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	21
2.4 APROXIMACIONES COMPUTACIONALES	22
2.5 BIOLOGÍA DE SISTEMAS.....	24
2.5.1 <i>El paradigma de la biología de sistemas</i>	27
2.5.2 <i>Principios básicos de la biología de sistemas</i>	28
2.6 MODELOS METABÓLICOS	30
2.7 ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUJO.....	35
2.8 RECONSTRUCCIONES METABÓLICAS DE CÉLULAS CEREBRALES.....	38
3. OBJETIVOS	40
3.1 GENERAL	40
3.2 ESPECÍFICOS	40
4. METODOLOGÍA	41
4.1 ETAPA 1: CREACIÓN DE UN BORRADOR DE LA RECONSTRUCCIÓN RED METABÓLICA (OBJETIVO 1 Y 2)	42
4.1.1 <i>Revisión de literatura y recolección de datos</i>	42
4.1.2 <i>Análisis bioinformático</i>	42
4.2 ETAPA 2: REFINAMIENTO MANUAL Y RECONSTRUCCIÓN DEL MODELO METABÓLICO	43
4.2.1 <i>Ensamblaje de la reconstrucción</i>	43
4.2.2 <i>Curación manual del modelo metabólico</i>	43
4.2.3 <i>Reacciones de transporte e intercambio</i>	43
4.3 ETAPA 3: CONVERSIÓN DE LA RECONSTRUCCIÓN A UN MODELO MATEMÁTICO (OBJETIVOS 3, 4 Y 5)	44
4.3.1 <i>Conversión de la red a un modelo predictivo basado en restricciones</i>	44
4.3.2 <i>Simulación de restricciones</i>	46
4.4 ETAPA 4: EVALUACIÓN DE LA RED (OBJETIVOS 3 Y 4)	48
4.4.1 <i>Análisis de gaps</i>	48
4.4.2 <i>Reacciones candidatas para gaps filling</i>	48
4.4.3 <i>Evaluación de las capacidades del modelo FBA</i>	50
4.4.4 <i>Función objetivo</i>	51
4.4.5 <i>Muestreo del espacio de flujo en un modelo Steady-State (RandomSampling)</i>	52
5. RESULTADOS	54
5.1 CARACTERÍSTICAS DE LA RED METABÓLICA DE ASTROCITO	55
5.2 EVALUACIÓN DE CAPACIDADES DEL MODELO ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUJOS	60
5.3 METABOLISMO ENERGÉTICO	61
5.4 CICLO DE GLUTAMATO Y GLUTAMINA.....	65
5.5 METABOLISMO LIPÍDICO	67
5.6 POTENCIAL DEL MODELO RECONSTRUIDO EN EL ANÁLISIS DE ESTADOS PATOLÓGICOS.....	68
5.6.1 CONDICIONES ISQUÉMICAS.....	69

6.	DISCUSIÓN.....	74
7.	CONCLUSIONES.....	79
8.	PERSPECTIVAS Y APLICACIONES.....	80
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	81
10.	ANEXOS.....	91

TABLA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS INTERACCIONES METABÓLICAS ENTRE ASTROCITOS Y NEURONAS.	19
FIGURA 2. CRECIMIENTO DE LAS SECUENCIAS GENÓMICAS Y LAS RECONSTRUCCIONES METABÓLICAS A ESCALA GENÓMICA.....	24
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS NODOS Y ARISTAS.....	26
FIGURA 4. EL PARADIGMA DE LA BIOLOGÍA DE SISTEMAS.	28
FIGURA 5. EL PROCESO DE REALIZAR UN MODELO DE RECONSTRUCCIÓN METABÓLICA..	32
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE MATRIZ ESTEQUIOMÉTRICA	37
FIGURA 7. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA.	41
FIGURA 8. REPRESENTACIÓN DE LAS PRINCIPALES RUTAS METABÓLICAS DEL ASTROCITO HUMANO.	54
FIGURA 9. CLASIFICACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LA RECONSTRUCCIÓN DEL MODELO METABÓLICO DEL ASTROCITO.....	58
FIGURA 10. VISTA GENERAL DE LOS FLUJOS ACTIVADOS EN LA RED METABÓLICA DE ASTROCITO.	62
FIGURA 11. COMPORTAMIENTO DE LOS FLUJOS METABÓLICOS DE LOS DISTINTOS METABOLITOS DE LA RED	66
FIGURA 12. INTERACCIONES METABÓLICAS EN EL ASTROCITO..	68
FIGURA 13. CAMBIOS DE LOS FLUJO EN RESPUESTA A LA SIMULACIÓN DE ISQUEMIA EN EL MODELO.....	71
FIGURA 14. PROPIEDADES METABÓLICAS CUALITATIVAS EN ISQUEMIA DE LA LITERATURA COMPARADO CON LOS RESULTADOS DEL MODELO.....	73

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. MODELOS GENERALES DE REDES METABÓLICAS A ESCALA GENÓMICA EN HUMANOS.	35
TABLA 2. MODELOS METABÓLICOS CEREBRALES DESARROLLADOS A LA FECHA	39
TABLA 3. TASAS DE FLUJO DE LOS DIFERENTES METABOLITOS DE LA RED METABÓLICA DEL ASTROCITO. ...	49
TABLA 4. FUNCIONES OBJETIVO METABÓLICAS USADAS EN EL ANÁLISIS DE LA RED DE ASTROCITO..	51
TABLA 5. SUMARIO DE LA COMPOSICIÓN DE LA RED METABÓLICA DE ASTROCITO POR COMPARTIMENTOS. ...	56

ABREVIATURAS

Acetil coenzima A	Acetil-CoA
Análisis de Balance de Flujo	FBA
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	TCA
Especies reactivas de oxígeno	ROS
G-aminobutirato	GABA
Human Protein Database	HPD
Integrated relational Enzyme database	IntEnz
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	KEGG
Modelos Metabólicos a escala Genómica	GEMS
Nicotinamida adenina dinucleotido	NAD ⁺
Nicotinamida dinucleótido fosfato de adenina en su forma reducida	NADPH
Nicotinamida dinucleótido fosfato de adenina oxidada	NADP ⁺
Number Enzyme Commission	EC-number
Peróxidos de hidrogeno	H ₂ O ₂
Reconstrucción metabólica humana	HMA
Reconstruction, Analysis and Visualization of Metabolic Networks	RAVEN
Trifosfato de adenosina	ATP
Vía pentosa fosfato	PPP

RESUMEN

Los astrocitos son las células más abundantes del sistema nervioso central; tienen un rol importante en el mantenimiento del metabolismo cerebral; ya que, participan de múltiples procesos claves como la neurogénesis, sinaptogénesis y neuroinflamación [1,2], regulan funcionalmente la actividad neuronal, su metabolismo energético y la síntesis de neurotransmisores [2,3]; en general, podemos afirmar que los astrocitos son considerados como los reguladores dinámicos de la producción neuronal y su actividad funcional [2].

El estudio experimental de los astrocitos ha permitido dilucidar la importante participación de estas células en aspectos funcionales específicos del sistema nervioso central. Sin embargo, se encuentra un gran vacío a nivel de la integración de los diferentes sistemas de interacción metabólicos y dinámicos que se llevan a cabo en estas células para generar respuestas funcionales y protectoras. En ese sentido, las herramientas bioinformáticas; específicamente, la biología de sistemas permite integrar el conocimiento biológico experimental a gran escala en un modelo matemático, para entender cómo las moléculas actúan juntas dentro de las redes de interacción que conforman la célula a estudiar, discriminando propiedades emergentes en este sistema total, las cuales no son fácilmente observables en un sistema particionado.

De esta manera, durante la última década, los modelos matemáticos de diferentes sistemas biológicos cerebrales han jugado un papel muy importante en la comprensión de los datos recolectados por diferentes modalidades “ómicas”. Estos han probado ser una herramienta útil en el análisis de diferentes procesos bioquímicos llevados a cabo por astrocitos y neuronas. La gran mayoría de los

modelos construidos a la fecha se han enfocado en pequeñas partes del metabolismo celular, por lo que no existe una representación completa que aproveche al máximo el conocimiento metabólico generado alrededor de estas células.

De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo se reporta la reconstrucción, validación y análisis del modelo estequiométrico, compartimentalizado del metabolismo astrocitario; tomando como punto de partida datos experimentales transcriptómicos. El resultado fue un modelo del astrocito humano completo y mejorado que incluye 5.659 reacciones y 5.007 metabolitos reacciones distribuidas en todos los compartimentos celulares (extracelular, citoplasma, mitocondria, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosoma, peroxisoma y núcleo). El modelo aquí presentado predice las principales vías metabólicas activas bajo el estado fisiológico dado, representa el comportamiento del astrocito a nivel de flujos en dichas rutas y simula los cambios en las actividades metabólicas en respuesta a las condiciones fisiológicas excitatorias e isquémicas.

A la fecha, esta es la representación más completa del metabolismo del astrocito realizada en términos de su cobertura e inclusión de genes, proteínas y vías metabólicas; de acuerdo con lo anterior, el modelo propuesto representa una aproximación computacional que puede ser potencialmente utilizada para avanzar en el estudio y la comprensión del comportamiento metabólico del astrocito en cualquier tipo de enfermedad neurológica o neurodegenerativa.

1. INTRODUCCIÓN

Los astrocitos son las principales y más numerosas células gliales encontradas en el cerebro [4]. En esencia, estas células juegan un papel fundamental en las funciones del sistema central nervioso y participan en procesos claves como la neurogénesis, sinaptogénesis y neuroinflamación [5,6], entre otros. Por otra parte, se sabe que existe una estrecha interacción entre los astrocitos y las neuronas, determinada específicamente por una relación metabólica en la que los primeros regulan funcionalmente la actividad neuronal, su metabolismo energético y la síntesis de neurotransmisores [7]; en general, podemos afirmar que los astrocitos son considerados como los reguladores dinámicos de la producción neuronal y su actividad funcional [8], desencadenando múltiples respuestas metabólicas a los diferentes estímulos e insultos a los que se expone el cerebro. Las respuestas metabólicas de estas células pueden involucrar alteraciones fisiológicas o patológicas que pueden contribuir a la aparición de diversas enfermedades neurológicas [9]. En ese sentido, los procesos metabólicos globales e interacciones dinámicas que se llevan a cabo en los astrocitos en los diferentes estadios metabólicos (fisiológicos y patológicos) requieren más investigación; ya que no están del todo claros y existe una gran discusión en torno a las variaciones de las rutas metabólicas en respuesta a diferentes estímulos. A la fecha, se han considerado diferentes aproximaciones experimentales que han permitido resolver en parte este problema. Por ejemplo, se han desarrollado técnicas de marcaje para la determinación de procesos bioquímicos en respuesta a diferentes estímulos (espectroscopia de resonancia magnética nuclear), herramientas genéticas (determinación de genes involucrados en las diferentes enfermedades

neurodegenerativas) y de análisis “ómicos” (transcriptómica, proteómica, metabolómica, etc.) especializados para comprender el comportamiento en diversos niveles celulares [10,11], no obstante la implementación y desarrollo de estas técnicas implican un proceso a largo plazo, asociado con altos costos económicos, tecnológicos y humanos lo que ha limitado en gran manera su alcance [12]. Por otro lado las diferentes técnicas experimentales se han centrado en el estudio pequeños sistemas de interacción; dejando de lado el estudio global e integrativo de la totalidad de sistemas metabólicos que componen las células y enfocándose en variaciones bioquímicas muy específicas que se dan en respuesta a los diferentes estímulos.

En respuesta a estos vacíos integrativos que pueden dejar las técnicas experimentales se han planteado diferentes aproximaciones computacionales basadas en la minería de datos, bioinformática y biología computacional. Estos abordajes computacionales permiten integrar datos a gran escala provenientes de diferentes fuentes experimentales, entre estos, datos genómicos, transcriptómicos, proteómicos, etc. Así mismo, la integración de los datos experimentales con las herramientas computacionales para el desarrollo de modelos matemáticos metabólicos ha permitido simular el comportamiento celular a nivel global. De esta manera el desarrollo de modelos se ha convertido en una opción viable y económica para el estudio del metabolismo; ya que, los datos necesarios para este tipo de aproximaciones se encuentran ya publicados y están disponibles en las diferentes bases de datos, lo cual disminuye considerablemente los tiempos y costos económicos asociados [12, 13]. Adicionalmente, el abordaje por medio de estas aproximaciones *in silico* que usan un enfoque holístico permite la

comprensión integrada del funcionamiento de diversos sistemas biológicos en distintos escenarios [14,15] profundizando en el entendimiento de cómo las interacciones internas y las interacciones con otros sistemas conllevan a la aparición de propiedades emergentes no observables en sistemas particionados usualmente utilizados en estudios experimentales [16].

En los últimos años, la elaboración de modelos computacionales metabólicos ha sido aplicado extensamente a los sistemas bacterianos, estos modelos han tenido gran aceptación científica gracias a los resultados exitosos que han sido aplicados en distintos campos industriales. Actualmente, estas aproximaciones computacionales se han extrapolado al desarrollo de modelos metabólicos en sistemas celulares humanos. Por ejemplo, previamente se desarrolló un modelo computacional que simulaba el exceso de glucosa en la mitocondria, este estudio permitió la detección de cambios en el metabolismo energético de este orgánulo, permitiendo evaluar distintos tipos de tratamientos específicos [17]. A nivel de modelos neurocomputacionales, se puede decir que son escasos los estudios que utilizan la integración de datos “ómicos” para el análisis computacional del comportamiento metabólico de las diferentes células en distintos contextos de enfermedad [18]. Sin embargo, se han reportado previamente modelos matemáticos basados en datos bioquímicos obtenidos de la literatura, donde han acoplado la actividad metabólica de astrocitos y neuronas en un ambiente que simula las variaciones metabólicas experimentadas en las diferentes enfermedades que afectan el cerebro. Hay que resaltar que los modelos que se han desarrollado a la fecha de las células cerebrales abarcan pequeños y específicos sistemas metabólicos por lo tanto la información que pueden brindar

es limitada y necesita de la inclusión e integración de mas sistemas metabólicos que se sabe que se producen en estas células. Por tal motivo, el principal objetivo de este trabajo es generar una reconstrucción matemática de astrocito que abarque un gran conjunto de datos metabólicos que permitan simular el comportamiento celular, las interacciones entre los genes, las enzimas y rutas metabólicas en estados fisiológicos y patológicos. Al día de hoy, este es el primer intento global de modelar estequiométricamente el metabolismo astrocitario . El resultado fue un modelo de astrocito humano que incluye 5.659 reacciones y 5.007 metabolitos distribuidos en todos los compartimentos celulares (extracelular, citoplasma, mitocondria, retículo endoplásmico, aparato de golgi, lisosoma, peroxisoma y núcleo). Para evaluar la red construida en condiciones fisiológicas y en respuesta a una privación de oxígeno y glucosa se utilizaron algoritmos matemáticos, tales como, el análisis de balance de flujos (FBA) y el Radom Sampling, por medio de estos algoritmos se realizaron las predicciones de flujos metabólicos los cuales fueron verificados mediante la comparación de las correspondientes distribuciones de flujo del modelo con la literatura, el modelo fue coherente con los flujos que se han determinado a nivel experimental.

Finalmente, el modelo reconstruido y mejorado del astrocito estará disponible en la base de datos Biomodels [118] para que de esta manera pueda ser utilizado en la generación, evaluación y direccionamiento de nuevas hipótesis de investigación. Así mismo, se podría emplear el estudio e identificación de blancos terapéuticos, determinación de biomarcadores y en el desarrollo de nuevas y mejores estrategias neuroprotectoras.

2. MARCO TEÓRICO

A continuación, se presenta el estado del arte de los factores fundamentales identificados para el correcto entendimiento del proyecto de grado.

2.1 Astrocito

Los astrocitos representan la población de células más abundante del cerebro, constituyendo más del 50% del total celular de la corteza cerebral. Inicialmente, los astrocitos se consideran elementos de soporte pasivo de las neuronas en el cerebro. Sin embargo, posteriormente se ha comprobado que desempeñan un papel importante en muchas de las funciones del sistema central nervioso [19]. La estrecha interacción de los astrocitos con las neuronas, específicamente la relación metabólica entre estos dos tipos celulares, regula funcionalmente la actividad neuronal, su metabolismo energético y la síntesis de neurotransmisores [20]. En términos generales, estas células gliales estructuralmente complejas y altamente fibrosas pueden ser entendidas como los reguladores dinámicos de la producción neuronal y su actividad.

Las funciones asociadas a los astrocitos resultan ser tan relevantes en el funcionamiento del cerebro, que algunos autores indican que la estructura y la función del cerebro está determinada fundamentalmente por este tipo celular [21]; así, la función y supervivencia de las neuronas estará determinada fuertemente por el correcto funcionamiento de los astrocitos, razón por la cual este tipo celular cumple no solo con funciones fisiológicas sino también con un rol fundamental en la respuesta a traumas y enfermedades [22,23]. Entre las funciones propuestas que cumplen los astrocitos podemos señalar que proporcionan el soporte trófico a

las neuronas vecinas y a los vasos sanguíneos. Proveen metabólicamente de manera optimizada los nutrientes a las neuronas y mantienen estable el pH extracelular eliminando el CO_2 que las neuronas generan como producto del metabolismo anaerobio que desarrollan normalmente [20]. Los astrocitos también intervienen en la modulación de las concentraciones de los diferentes neurotransmisores, principalmente del glutamato, en el espacio extracelular y se encargan de mantener los gradientes iónicos dependientes de energía (Ca^{++} , Na^+ , K^+) [24,25] [. También se les ha implicado en el control de la barrera hematoencefálica y juegan un papel protector frente a la toxicidad de especies reactivas de oxígeno(ROS), Peróxidos de hidrogeno(H_2O_2), metales y xenobióticos, ya que poseen sistemas enzimáticos específicos para su eliminación [26]. Se ha descrito que los astrocitos también intervienen en la producción de factores tróficos (NGF, factor de crecimiento nervioso; CNT, factor neurotrófico ciliar, entre otros) a las neuronas [27] y oligodendrocitos cercanos, particularmente después de una lesión [28,29]. Para llevar a cabo todas esas funciones la astroglia requiere una considerable cantidad de energía metabólica.

Los astrocitos tienen contacto con los vasos sanguíneos, de donde obtienen la glucosa como energía que se transporta a través de la circulación sanguínea [30]. La glucosa que se utiliza en el cerebro es captada por los astrocitos, quienes actúan como intermediarios de oxidación para su posterior transporte hasta las neuronas [31,32]. El cerebro es un órgano que consume grandes cantidades de energía, esos grandes requerimientos de energía son soportados metabólicamente por el astrocito. Por ese motivo, el astrocito es capaz de almacenar glucógeno y utilizar sustratos diferentes a la glucosa como respuesta a

los requerimientos celulares energéticos [33]. Una gran cantidad de datos experimentales, sugieren que existe cierta especialización en el uso de estos sustratos por parte de las células gliales.

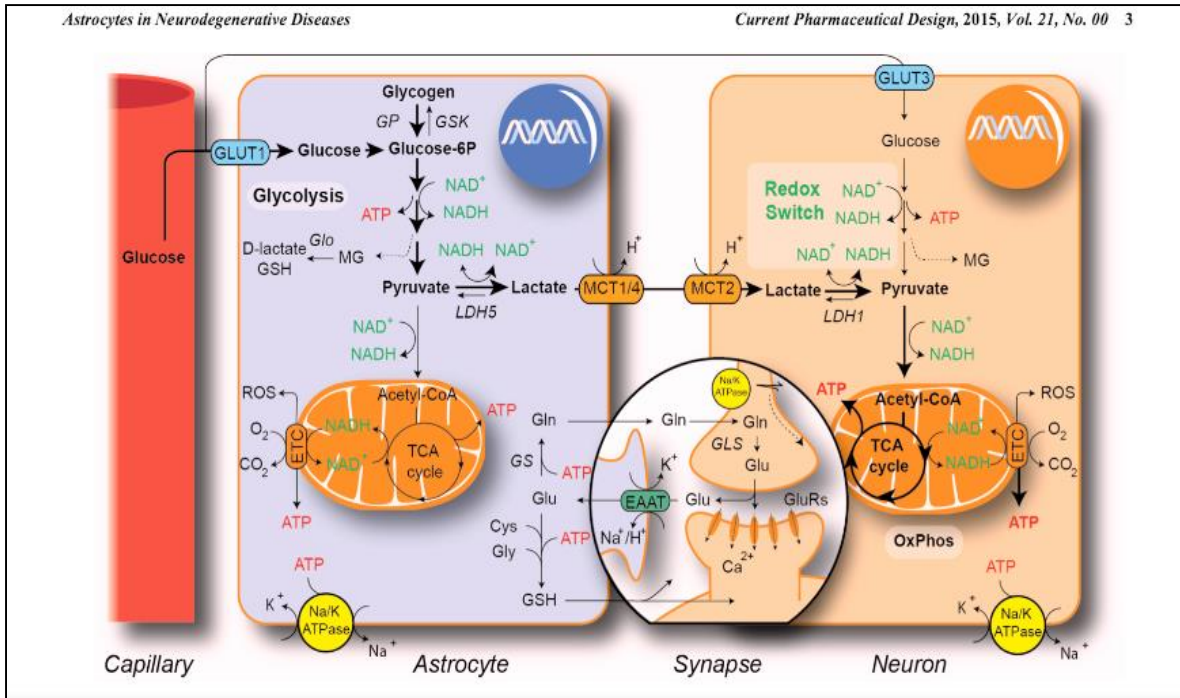


Figura 1. Representación esquemática de las interacciones metabólicas entre astrocitos y neuronas.

Los sustratos que son preferencialmente captados y metabolizados por las células gliales, son aquellos que se incluyen directamente en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), como por ejemplo: acetato, piruvato, succinato, aspartato, glutamato, g-aminobutirato (GABA), fenilalanina y leucina que son preferencialmente captados y metabolizados por las células gliales [34,35]. Estas células son especializadas en su metabolismo y desarrollan una actividad complementaria a las neuronas. Para esto, los astrocitos poseen mecanismos de intercambio o bombas para el transporte específico de neurotransmisores o

compuestos moduladores tales como el g-aminobutirato (GABA), L-glutamato, L-aspartato, glicina, serotonina, noradrenalina, dopamina y adrenalina [36].

2.2 Isquemia

La Organización Mundial de la Salud, define la enfermedad cerebrovascular como el rápido desarrollo de signos focales o globales de compromiso de la función cerebral, con síntomas de veinticuatro horas o más de duración o que lleven a la muerte, sin otra causa que el origen vascular. La importancia de la enfermedad cerebrovascular se basa en su alta tasa de recurrencia, la que lo convierte en un problema de salud pública que genera un gran impacto sobre la calidad de vida por la discapacidad que produce y su alto índice de mortalidad [37].

La isquemia cerebral es una disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo con una consecuente disminución del aporte de oxígeno y sustratos energéticos necesarios para mantener el funcionamiento de las células del cerebro [38]. El pronóstico de los pacientes con enfermedad cerebrovascular depende de la extensión de la lesión o la severidad de la isquemia, y los mecanismos lesivos fisiopatológicos posteriores [39]. Una interrupción del flujo sanguíneo cerebral y por ende, la carencia de oxígeno y glucosa, desencadena una secuencia de fenómenos moleculares a corto y largo plazo en las diferentes células cerebrales que se inician con el fracaso energético relacionado con la interrupción de los procesos de fosforilación oxidativa, déficit en la producción de trifosfato de adenosina (ATP) e interrupción de los gradientes iónicos transmembranales [40]. Esta secuencia de fenómenos celulares puede confluir en dos modalidades de muerte: la primera, relacionada directamente con el déficit energético y la

segunda, que corresponde a la muerte celular programada o apoptosis [41]. A la fecha no se han desarrollado tratamientos efectivos regenerativos y neuroprotectores que detengan o retrasen los efectos de la isquemia cerebral [33].

2.3 Implicación de los astrocitos en patologías del sistema nervioso

central

El cerebro contiene pequeñas reservas de energía a pesar de ser un órgano que requiere el consumo de grandes cantidades de energía. Las células cerebrales son altamente dependientes de un ininterrumpido flujo de sustratos energéticos provenientes de la circulación [42]. El daño en este proceso resulta en perturbaciones de las funciones neurológicas, pérdida de la conciencia en muy pocos minutos.

Recientemente, se han asociado los astrocitos con el desarrollo y mantenimiento de diferentes enfermedades cerebrales [43]. Esto puede ser explicado si consideramos la función que los astrocitos desempeñan en el mantenimiento de un correcto ambiente neuronal, su rol en la regulación del flujo sanguíneo cerebral y el mantenimiento de la función sináptica [44]. Cualquier disfunción de los astrocitos determinará cambios profundos que generalmente estarán asociados a diferentes fenotipos de enfermedad. Sin embargo y pese a su importancia, aún falta mucho por entender de sus características moleculares y funcionales, especialmente al considerar fisiopatologías [45].

2.4 Aproximaciones computacionales

Desde que Gregorio Mendel describió la existencia de “unidades discretas” por medio de las cuales la información es pasada de una generación a la siguiente y que estas determinan la forma y la función de un organismo, la relación genotipo-fenotipo ha tenido una importancia fundamental en las ciencias de la vida. Para los rasgos monogénicos, la relación genotipo-fenotipo puede ser fácilmente comprendida. Sin embargo, mayores rasgos fenotípicos implican múltiples productos de genes. Esto hace de la relación genotipo-fenotipo un desafío para reconstruir y comprender, dadas las complejas interacciones que se pueden formar entre los productos génicos [46].

Con la publicación en 1995 del primer genoma secuenciado completamente se hizo posible identificar todos los productos genéticos implicados en los procesos biológicos complejos de un solo organismo [47]. Desde ahí, un gran número de tecnologías y conocimientos han servido para definir los componentes moleculares en la célula, aunque todavía no se conocen en su totalidad, hoy en día gracias al estudio de las transformaciones bioquímicas metabólicas se hace posible reconstruir a una escala genómica, las redes metabólicas de un organismo de una manera detallada.

Anteriormente los análisis moleculares sólo nos permitían obtener la información básica sobre de su función, su composición química y las situaciones donde era utilizada. La aparición de nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento ha permitido identificar miles de genes de manera simultánea, llevando a los investigadores a ver las células como un sistema completo, en lugar de centrar su atención en los componentes individuales [48]. Este hecho, sumado al desarrollo

de análisis computacionales y de nuevas herramientas bioinformáticas, ha permitido integrar tanto componentes moleculares como químicos para crear modelos computacionales de redes metabólicas completas. La unión de estos conocimientos matemáticos, bioquímicos, genómicos y genéticos permiten así la formulación de Modelos Metabólicos a escala Genómica (GEMS), los cuales permiten predecir rasgos fenotípicos basados en la composición genética y bioquímica del organismo objetivo [46].

A raíz del crecimiento en la cantidad de genomas secuenciados y de la mayor disponibilidad de información y con la creación de la primera reconstrucción metabólica a escala genómica en 1999 y sus respectivas aplicaciones in-silico [46], se ha presentado un gran crecimiento de los trabajos en este tema [49,50]. (figura 2). En el 2007 se planteó la posibilidad de realizar reconstrucciones que incluyeran el total del metabolismo humano; con el fin, de estudiar fenotipos metabólicos de relevancia médica. Se destacan dos modelos metabólicos, que a la fecha han sido las más importantes reconstrucciones del metabolismo humano estas son: Recon 1 [48] y Human Metabolic Atlas [49,51].

Estos modelos han permitido nuevos enfoques de la biología de sistemas dirigidos hacia estudios de fisiología, farmacología, descubrimiento de biomarcadores entre otros [52,53]. El alcance de las reconstrucciones es amplio y continúa creciendo. Actualmente, se han realizado cuantiosos estudios utilizando estas reconstrucciones humanas, para estudios de cáncer, diabetes, interacción huésped-patógeno, desórdenes metabólicos hereditarios y objetivos de drogas, entre otros [54,14,55].

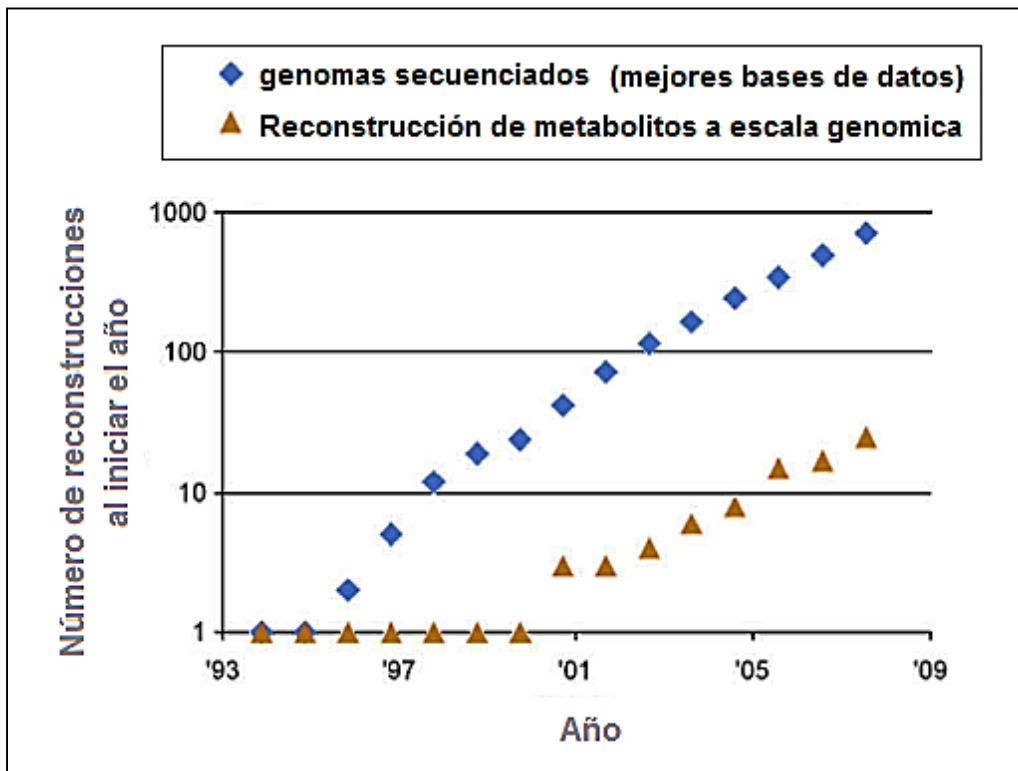


Figura 2. Crecimiento de las secuencias genómicas y las reconstrucciones metabólicas a escala genómica. El número de reconstrucciones de red ha crecido de manera exponencial, a un ritmo similar al que han aparecido las secuencias genómicas.

Tomado de (Palsson 2009) [46].

2.5 Biología de sistemas

Convencionalmente, en el estudio de los procesos biológicos se utiliza el método científico clásico, que se basa en la confirmación o refutación de una hipótesis al confrontarla con los resultados experimentales. La biología sistémica utiliza un enfoque basado en la modelización matemática de los procesos en estudio [46]. Como resultado de la simulación, al poner a funcionar los modelos matemáticos con los que se representa el proceso, se obtiene una serie de predicciones del

estado de dicho proceso biológico que corresponderían a los resultados experimentales esperados [56]. Durante las simulaciones, la red de interacciones entre los elementos que componen el proceso biológico se representa mediante un sistema de ecuaciones diferenciales. Los valores de las características de dichos elementos a distintos tiempos y bajo diversas condiciones experimentales (simuladas), son predecibles debido a que la dinámica del estado de ese sistema modelado es calculable matemáticamente [57].

Gracias a el uso de diferentes tecnologías "ómicas" una gran cantidad de información sobre diferentes componentes celulares está actualmente disponible [58]. La biología de sistemas integra los enfoques experimentales (ómicas) y computacionales para alcanzar el objetivo global de explicar y predecir comportamientos celulares complejos de los sistemas biológicos [59]. Se diferencia de los enfoques tradicionales de biología en que tiene por objeto el estudio de los sistemas biológicos (moléculas, células, organismos, especies, ecosistemas, etc.) a diferentes niveles, analizando las interacciones y/o asociaciones de los componentes totales del sistema, en lugar del estudio particular de las propiedades de los componentes individuales en sí mismos [60]. Esta ciencia facilita la representación, descripción y simulación de modelos complejos como el de las enfermedades, visualizándolas como redes moleculares dinámicas alteradas, lo cual es importante en el campo de la medicina; ya que, facilita la comprensión y modelación de diferentes patologías como una red compleja, permitiendo una aproximación a la aplicación de la medicina personalizada y preventiva [61].

Los sistemas bajo la perspectiva de sistemas y redes, se pueden representar con nodos (genes, moléculas mensajeras, metabolitos, productos funcionales como RNA, proteínas, etc.) y aristas que es cada puente entre dos nodos la cual representa una relación que puede ser física, enzimática o funcional [62]. (Figura 3)

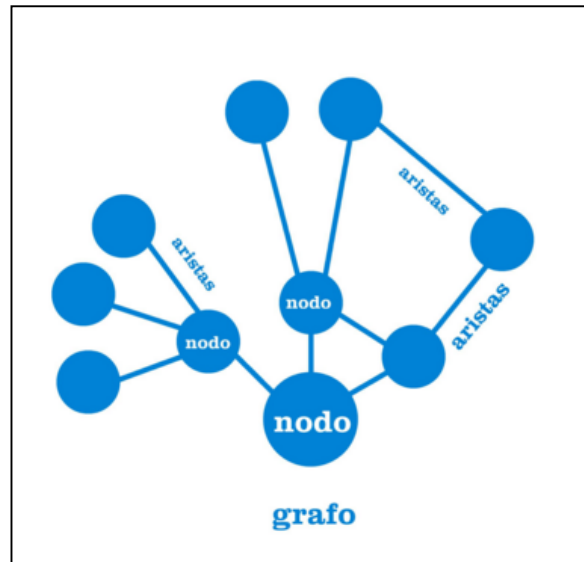


Figura 3. Representación de asociación entre los nodos y aristas. Los nodos son el punto de unión de las aristas y estas establecen relaciones entre los nodos .

De esta forma, la estructura y topología de las redes obtenidas estarían moduladas por perturbaciones externas (P.e. ambiente) e internas (P.e. alteraciones en la expresión de genes, mutaciones, etc.), y las propiedades específicas de la red determinarían el fenotipo (P.e. enfermedad) Considerar las enfermedades como redes perturbadas o alteradas permite tener un marco conceptual que acerca el conocimiento descubierto vía biología de sistemas a la identificación y el desarrollo de nuevos blancos para medicamentos y estrategias terapéuticas [55].

2.5.1 El paradigma de la biología de sistemas

La capacidad de generar una lista detallada de los componentes biológicos, determinar sus interacciones, y generar todo el conjunto de datos del genoma ha dado lugar al surgimiento de la biología de sistemas, actualmente podemos formular una descripción matemática de la totalidad de tales interacciones, identificar las limitaciones de la red y aplicar los principios para evaluar posibles funciones fisiológicas en un entorno determinado.

Todo lo que conlleva el proceso anterior, se basa en un paradigma central de la biología de sistemas: componentes moleculares redes modelo computacional estudios fisiológicos [46] que relaciona el genotipo con el fenotipo mediante la reconstrucción y el modelo in-silico (figura 4) y se compone de cuatro pasos [63]:

1. Generación de “ómicas” y recogida de datos de la literatura sobre el organismo objetivo, es decir, enumerar los componentes biológicos y procesos de interés.
2. Reconstrucción de la red y la formulación de una reconstrucción bioquímica, genética y genómica del metabolismo basado en los conocimientos adquiridos previamente.
3. Conversión de la reconstrucción en un formato matemático y la aplicación de herramientas de análisis in-silico.
4. Los modelos se utilizan para analizar, interpretar y predecir resultados experimentales. La predicción corresponde esencialmente a la generación de hipótesis específicas que pueden ser probadas experimentalmente.

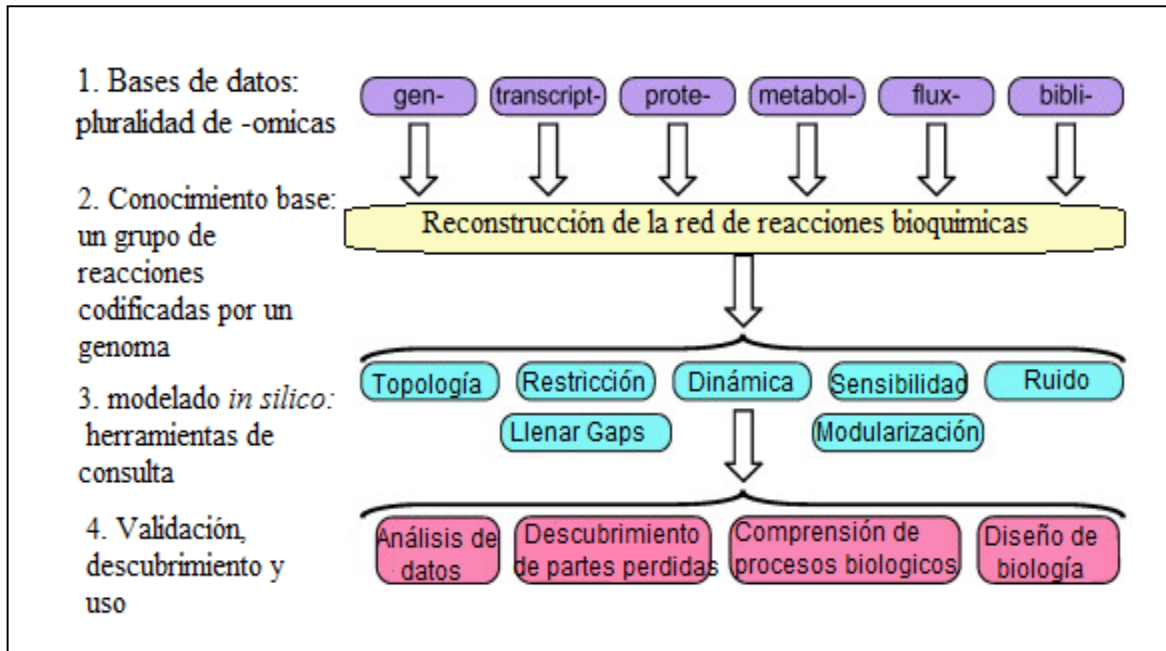


Figura 4. El paradigma de cuatro pasos principales en la aplicación de la biología de sistemas.

Tomado de (Palsson 2009) [46]

2.5.2 Principios básicos de la biología de sistemas

Para especificar y determinar el éxito de las reconstrucciones, es preciso exponer los siguientes axiomas [64]:

a) *Todas las funciones celulares se basan en la química.*

Una declaración simple, pero importante, ya que implica los acontecimientos fundamentales en una célula puede ser descrito por las ecuaciones químicas. Estas ecuaciones, a su vez, vienen con información química y principios físico-químicos.

b) *Secuencias genómicas anotadas junto con datos experimentales permiten la reconstrucción de las redes metabólicas a escala genómica.*

El proceso de reconstrucción es un conjunto sistemático a gran escala de la información en un marco de Calidad-Controlada/Calidad-Asegurado (QC / QA, por sus siglas en inglés) [57,63] que conduce a un conocimiento base sobre datos establecidos bioquímicos, genéticos, y genómico representados por una red de reconstrucción.

c) La función celular depende de un contexto específico.

Cuando una célula se coloca en un entorno particular, expresa un subconjunto de sus genes en respuesta a señales ambientales. La abundancia de los componentes celulares se puede perfilar usando las disciplinas “ómicas”, es decir, la transcriptómica, la proteómica, la metabolómica, etc. Estos datos provenientes de las “ómicas” se pueden mapear en una red de reconstrucción para luego ser adaptados a la situación particular que se desee.

d) Las células operan bajo una serie de restricciones.

Factores que limitan las funciones celulares se dividen en cuatro categorías principales: fisicoquímicos, topológicos, ambientales y reguladores (básicamente limitaciones o restricciones autoimpuestas). Estas limitaciones no pueden ser violadas permitiendo la estimación de todos los estados funcionales (fisiológicos) que puede lograr la reconstrucción genómica. Matemáticamente, estos estados funcionales se traducen en sub-espacios fundamentales asociados con la matriz estequiométrica, cuyas propiedades pueden ser caracterizadas. En la matriz estequiométrica denominada matriz S (donde S representa estequiométrica), las filas corresponden a los metabolitos y las columnas a las reacciones en la red. Los coeficientes de los sustratos y productos de cada reacción son introducidos en la celda correspondiente de la matriz.

e) *Masa y energía se conservan.*

Esta declaración es una de las leyes básicas de la física. Dado que todas las ecuaciones químicas pueden ser descritas por los coeficientes estequiométricos y una serie de ecuaciones químicas pueden ser descritas por una matriz estequiométrica, esto significa que todos los estados estacionarios de una red pueden ser descritos mediante una ecuación lineal simple, $S \cdot \bar{v} = 0$, donde \bar{v} es un vector de flujos a través de reacciones químicas. Por lo tanto, el cálculo de los estados funcionales de una red está validado por la química conocida.

f) *Las células evolucionan bajo una presión selectiva en un ambiente determinado.*

Esta afirmación darwinista tiene principios de optimidad implícitos en él. Por lo tanto, si se conoce la presión selectiva, se puede definir una función objetivo y determinar estados óptimos dada una reconstrucción de la red y las restricciones que la rigen.

Cada una de estas declaraciones por sí solas son casi triviales y aceptadas en diversas disciplinas científicas como fundamentales. En conjunto, sin embargo, se combinan para formar la base conceptual de la reconstrucción basada en restricciones y permitir el desarrollo de la relación genotipo-fenotipo en el metabolismo.

2.6 Modelos metabólicos

El conocimiento bioquímico del que se dispone de las transformaciones metabólicas ha hecho posible la reconstrucción, a una escala genómica, de redes metabólicas para diferentes sistemas. Los modelos metabólicos han demostrado

tener una capacidad sorprendente para simular el crecimiento de las células vivas. El metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas y procesos fisicoquímicos que ocurren en el organismo o en una célula con el fin de mantener la vida, está determinado por la genética, el ambiente y la nutrición del organismo. Las anormalidades metabólicas están implicadas como la causa de diversas enfermedades, por lo cual, durante los últimos cien años, se ha tenido gran interés en describir la lista de reacciones que comprenden el metabolismo de un organismo y actualmente una gran parte de estas se encuentran catalogadas. Con el enfoque actual que ha brindado la bioinformática y la gran cantidad de datos que existen sobre los sistemas biológicos se tiende a integrar la mayor cantidad de información posible para ser analizada de forma global en modelos para simular, predecir y comprender su comportamiento [65].

Para el análisis sistemático de modelos, la biología de sistemas emplea dos métodos: de Top-Down (deductivo) y de Bottom-Up (inductivo), ambos apuntan a la comprensión de las interacciones que surgen en diversas condiciones fisiológicas, pero desde perspectivas diferentes. La estrategia de “Top-Down” (deductivo) analiza desde un punto de vista “global” y va dividiendo el sistema en partes más pequeñas que interactúan entre sí, generalmente requiere medidas estadísticas. Por otra parte, el enfoque “Bottom-Up” primero especifica los detalles de los componentes individuales y las interacciones de un sistema, los componentes son puestos juntos para formar un sistema más grande, proporcionando así un mecanismo de base para el estudio de su biología subyacente basado en el conocimiento de las partes específicas [63].

En el proceso de generar modelos metabólicos un paso muy importante es la reconstrucción de la red metabólica. La reconstrucción implica varios pasos, el proceso de realizar un modelo de reconstrucción metabólica a escala genómica se ilustra en la figura 5.

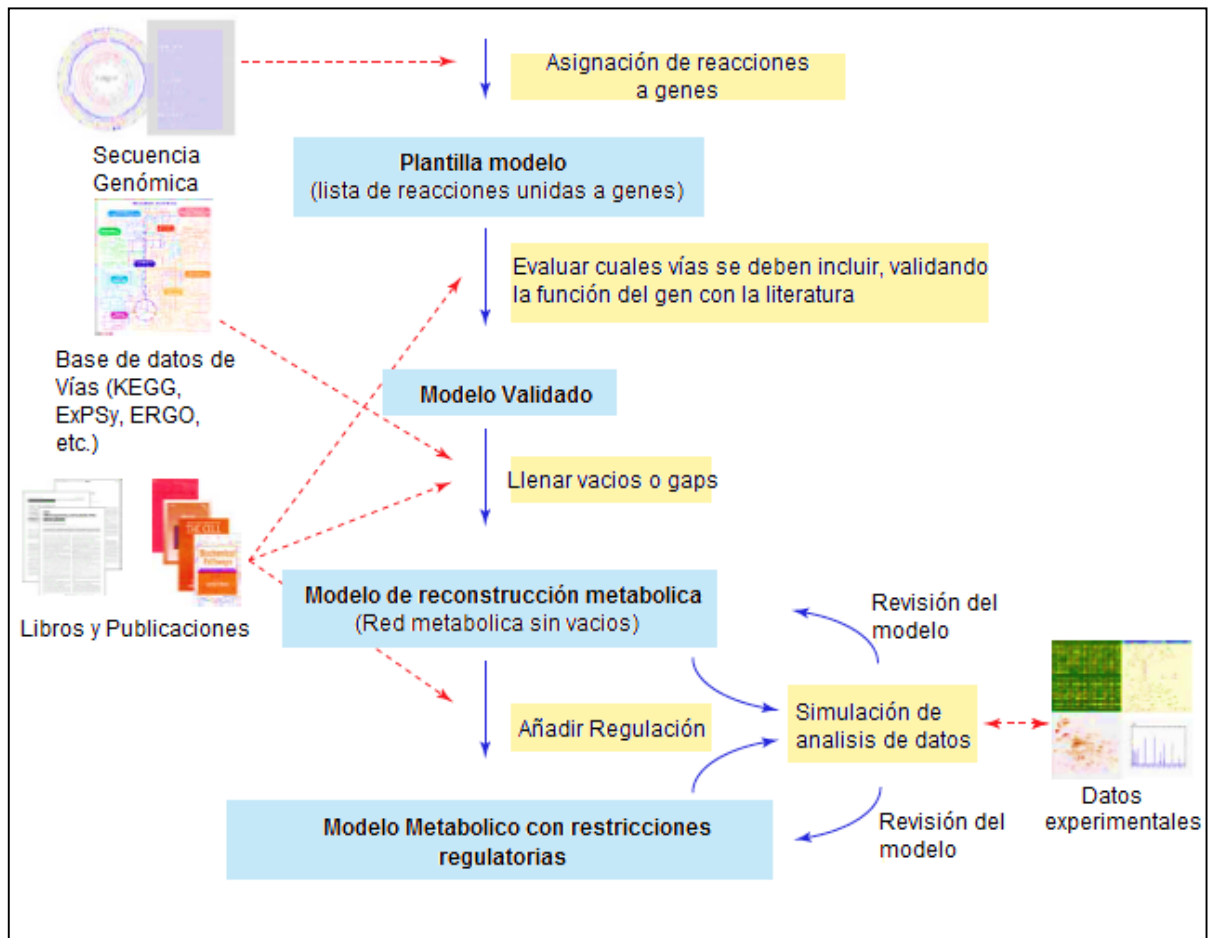


Figura 5. El proceso de realizar un modelo de reconstrucción metabólica. El flujo de información es representado como flechas discontinuas rojas y las acciones como flechas azules.

Tomado de Borodina 2005 [47].

La reconstrucción por lo general comienza con la asignación de las reacciones a los genes anotados en la secuenciación del genoma. La presencia de las distintas vías en la célula es completamente validada utilizando la literatura y publicaciones.

El siguiente paso es identificar las brechas o vacíos en la red metabólica y tratar de llenarlos buscando los genes que faltan. El modelo puede ser validado frente a datos fisiológicos o datos provenientes de metodologías “ómicas” u otros. Los datos obtenidos pueden ser analizados utilizando el modelo. La adición de restricciones regulatorias mejora el rendimiento del modelo, ya que resuelve las incoherencias cuando la regulación ocurre en niveles más altos que el nivel de flujo. Algunas partes del proceso de reconstrucción (por ejemplo, la construcción de la plantilla modelo, la evaluación de las vías presentes y el llenado de vacíos) se puede automatizar mediante el software disponible, sin embargo, la verificación científica es preferida para decisiones finales [63].

Varias reconstrucciones metabólicas de redes estequiométricas han aparecido, en representación de los tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eukarya [59]. Los tamaños de estas reconstrucciones van desde decenas hasta cientos de reacciones y genes. Las reconstrucciones de redes a escala genómica son cada vez más frecuentes, promovidas por la abundancia de datos de secuenciación. Estas reconstrucciones de redes a escala genómica incluyen reacciones de las vías metabólicas centrales, tales como la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato y el ciclo del ácido cítrico, así como las reacciones que están involucradas en la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos, la síntesis de la pared celular, la biosíntesis de cofactores, y utilización alterna de fuentes de nitrógeno y carbono [59].

La reconstrucción de las redes a escala del genoma metabólicas en microorganismos está bien desarrollada y se ha aplicado con éxito en el cálculo de fenotipos metabólicos microbianos para una variedad de aplicaciones biológicas.

Aunque la composición química de las enzimas y metabolitos varía, el marco general de metabolismo es consistente a través de todos los organismos. Gracias a esto varios estudios metabólicos se han realizado para una amplia gama de especies utilizando metodologías similares. Por lo tanto, el esfuerzo actualmente está centrado en extender el éxito del desarrollo y análisis de redes al metabolismo humano. Teniendo en cuenta que las transformaciones bioquímicas del metabolismo humano están bien estudiadas y documentadas [46].

El genoma humano secuenciado y anotado más el estudio intensivo de numerosos genes y enzimas metabólicas, han dado como resultado una base de conocimiento colectivo, o "biblioma", que incluye mecanismos de reacción e interacciones bien caracterizadas. Esto sumado al empleo del método Bottom-Up en reconstrucciones de redes a escala genómica ha facilitado la creación de redes metabólicas a escala genómica en humanos (tabla 1) [49].

La implementación exitosa de la biología de sistemas en la reconstrucción del metabolismo humano puede tener consecuencias beneficiosas en un amplio grupo de enfermedades tales como la diabetes, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, e incluso sobre el cáncer, debido a que esta muestra fenotipos metabólicos muy anormales y en la quimioterapia del cáncer se utilizan como objetivo de la terapia ciertos metabolitos. Más recientemente, crece la evidencia de que los efectos del metabolismo sobre las funciones cerebrales fisiológicas y fisiopatológicas son significativas, como en el caso de la esquizofrenia para trastornos neurodegenerativos [66].

NOMBRE	AUTOR	AÑO	RXN	MET	ENFOQUE
Recon 2	Duarte et al.	2010	7440	5063	Lista global de reacciones metabólicas humanas relación proteínas-genes.
EHMN	Hao et al.	2007 /2010	8181	6007	Lista de reacciones metabólicas humanas globales, no compartimentalizadas.
HepatoNet1	Gille et al.	2010	2539	777	Una reconstrucción metabólica completa del hepatocito humano para el análisis de la fisiología del hígado.
Ac/FAO module.	Sahoo et al.	2012	352	139	Se realizó compendio de errores innatos del metabolismo mapeado en la red metabólica humana.
Enterocytes reconstruction	Sahoo and Thiele.	2013	300	150	Compendio de reacciones químicas que componen el enterocito.
Human metabolic atlas	Adil Mardi noglu.	2013	8000	4000	Reconstrucción metabólica completa de distintitos tipos celulares y tejidos a nivel humano

Tabla 1. Modelos generales de redes metabólicas a escala genómica en humanos.

2.7 Análisis de balance de flujo

El análisis de Balance de Flujo (FBA) es un método ampliamente utilizado para el estudio de redes bioquímicas, en particular las reconstrucciones metabólicas a escala genómica que se han construido en la última década. El FBA calcula el flujo de metabolitos a través de la red metabólica, lo que hace posible predecir la tasa

de crecimiento de un organismo o de la producción de un metabolito importante a nivel biotecnológico [67]. Esto lo convierte en una herramienta importante para aprovechar el conocimiento codificado en los múltiples modelos de reconstrucción que existen y los que se construyan en adelante.

El primer paso en el FBA es representar matemáticamente las reacciones metabólicas, la característica principal de esta representación es una tabulación, en la forma de una matriz numérica, de los coeficientes estequiométricos de cada reacción [68].

Las reacciones metabólicas se representan como una matriz estequiométrica (S), cada fila de esta matriz representa un compuesto único y cada columna representa una reacción, las celdas son los coeficientes estequiométricos de los metabolitos que participan en una reacción. Se coloca un coeficiente negativo por cada metabolito consumido, y un coeficiente positivo para cada metabolito que se produce (Figura 6).

La estequiometría impone restricciones en el flujo de metabolitos a través de red y estas restricciones son el corazón del FBA, ya que es lo que permite diferenciar este análisis de otros que se basan en ecuaciones biofísicas.

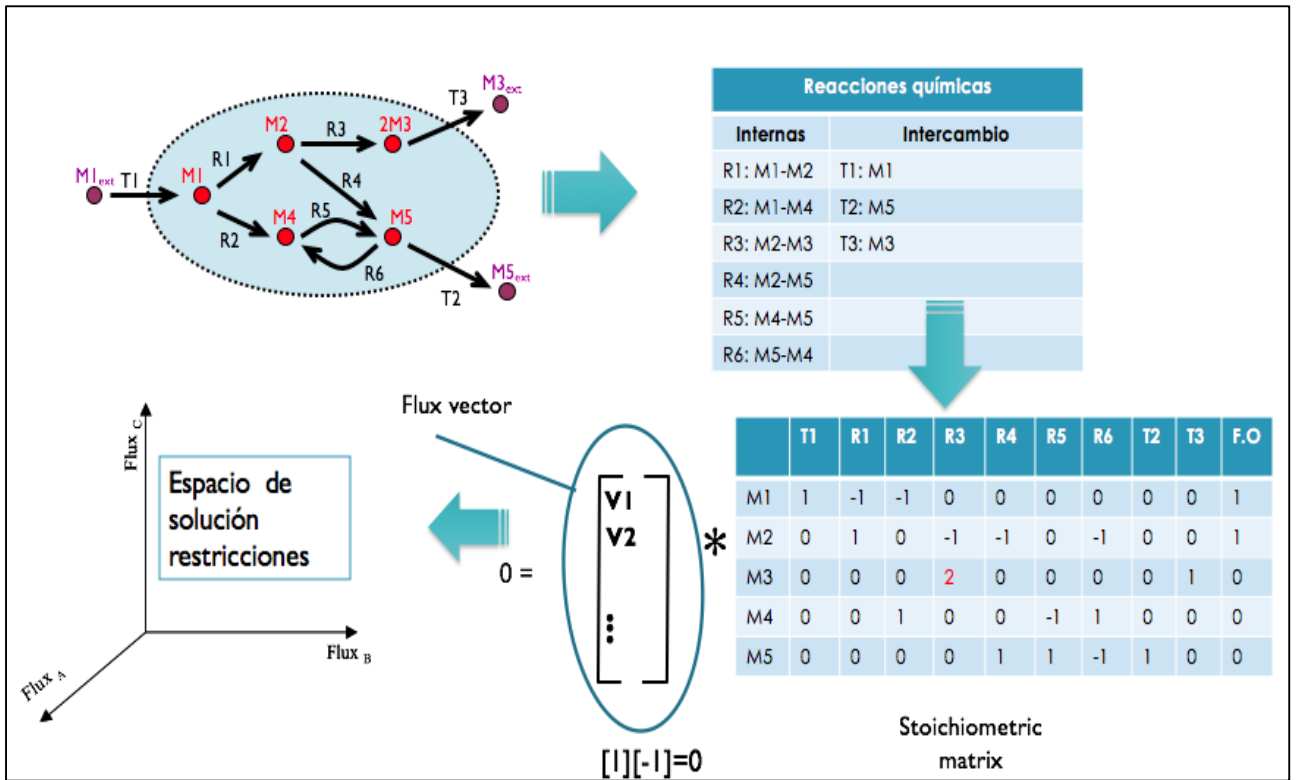


Figura 6. Representación gráfica de matriz estequiométrica (S).

Las restricciones se representan de dos formas, como ecuaciones de equilibrio de las reacciones de entrada-salida y como desigualdades que imponen límites en el sistema. La matriz estequiométrica (es decir, la masa) impone restricciones en el balance de flujo del sistema, asegurando de esta forma que la cantidad total de cualquier compuesto que se produce es igual a la cantidad total que se consume en estado estacionario. A cada reacción también se le puede imponer límites superiores e inferiores, estos límites definen las velocidades a las que cada metabolito será consumido o producido por cada reacción. Otras limitaciones que implican la búsqueda de datos experimentales también se pueden añadir.

El siguiente paso en el FBA es definir el objetivo biológico que es relevante para el problema que se estudia. En el caso de la predicción de crecimiento, el objetivo es la producción de biomasa, la velocidad a la que los compuestos metabólicos se convierten en componentes de la biomasa tales como ácidos nucleicos, proteínas, y lípidos [69]. Matemáticamente, el objetivo está representado por una “función objetivo” que indica cuánto de cada reacción contribuye al fenotipo. En conjunto, las representaciones matemáticas de las reacciones metabólicas y del fenotipo definen un sistema de ecuaciones. En el FBA, estas ecuaciones se resuelven usando programación lineal. Muchos algoritmos de cálculo de programación lineal existen, y puede identificar rápidamente soluciones óptimas a los grandes sistemas de ecuaciones [70].

2.8 Reconstrucciones metabólicas de células cerebrales

A la fecha, se han publicado diferentes modelos metabólicas cerebrales contruidos a partir de distintos datos experimentales encontrados en la literatura (tabla 1). Los modelos desarrollados han utilizado diferentes aproximaciones dinámicas y no dinámicas; así mismo, emplean diferentes herramientas para el análisis de la red y para la simular distintos escenarios del acople metabólico entre astrocitos y neuronas.

Como se puede observar en la tabla los modelos desarrollados de las células cerebrales comprenden una limitada cantidad de reacciones y genes. Estos modelos se han sido generados con el objetivo de estudiar procesos metabólicos esenciales y específicos desarrollados en las células cerebrales; por tal motivo,

estas redes metabólicas tienen un alcance limitado. El desarrollo de un modelo metabólico robusto es un reto que constituye el principal objetivo de este trabajo.

<i>Autores</i>	<i>Modelo</i>	<i>Pathways</i>	<i>Herramienta</i>	<i>Met</i>	<i>Rxn</i>	<i>Gen</i>
Nathan E. Lewis [71]	Astrocito-Neurona glutamatergic a, GABAergica, y cholinergica.	Metabolismo energético	Monte Carlo sampling	983, 983, and 987	1066, 1067, and 1070	403
Tunahan Çakır [72]	Astrocito-Neurona	Metabolismo central de carbono	FBA y análisis de metabolitos reporteros	524	630	570
Tunahan Çakır [73]	Astrocito-Neurona	Metabolismo central de carbono	FBA	216	217	60
Daniela Calvetti [74]	Astrocitos, Neurona glutamatergic a, and GABAergica	Glutamato-Glutamina	Monte Carlo sampling	20	28	N/A
Rossana Occhipinti [75]	Neurona GABAergic y astrocitos	Metabolismo energético	Monte Carlo sampling	34	17	N/A
Daniela Calvetti [76]	Astrocitos, Neurona glutamatérgic a y GABAergica	Metabolismo energético	Monte Carlo sampling	28	31	N/A
Aristotle Chatziioannou [77]	Astrocito-Neurona	Glutamato-Glutamina	FBA	13	19	N/A
AstroModel	Astrocito	Metabolismo general	FBA-Monte Carlo sampling	5007	5	3670

Tabla 2. Modelos metabólicos cerebrales desarrollados a la fecha

3. OBJETIVOS

3.1 General

Construir, validar y analizar el modelo estequiométrico compartimentalizado del metabolismo astrocitario; tomando como punto de partida datos experimentales transcriptómicos.

3.2 Específicos

3.2.1 Establecer el conjunto de reacciones mínimas y suficientes requeridas para generar la base del modelo computacional del astrocito.

3.2.2 Enriquecer la base del modelo computacional metabólico de astrocito con datos bioquímicos obtenidos de diferentes bases de datos que contienen información de sistemas humanos.

3.2.3 Generar un modelo computacional del metabolismo del astrocito.

3.2.4 Determinar los mecanismos metabólicos característicos del astrocito bajo una respuesta excitatoria y durante un insulto isquémico por medio de una revisión exhaustiva de la literatura.

3.2.5 Estipular un conjunto de parámetros de restricción que serán usados para las simulaciones en el modelo computacional.

3.2.6 Establecer y validar el fenotipo metabólico del astrocito durante una respuesta excitatoria y un insulto isquémico.

4. METODOLOGÍA

A continuación, se presentan las diferentes estrategias, métodos y herramientas propuestas para construir, validar y analizar el modelo estequiométrico compartimentalizado del metabolismo astrocitario.

Se han propuesto a la fecha diferentes protocolos para la reconstrucción y análisis de modelos metabólicos [78,11,79]. En este trabajo se siguió la metodología propuesta por Thiele y Palsson, en donde se ejecutan cuatro etapas para la correcta reconstrucción de una la red metabólica (figura 7).

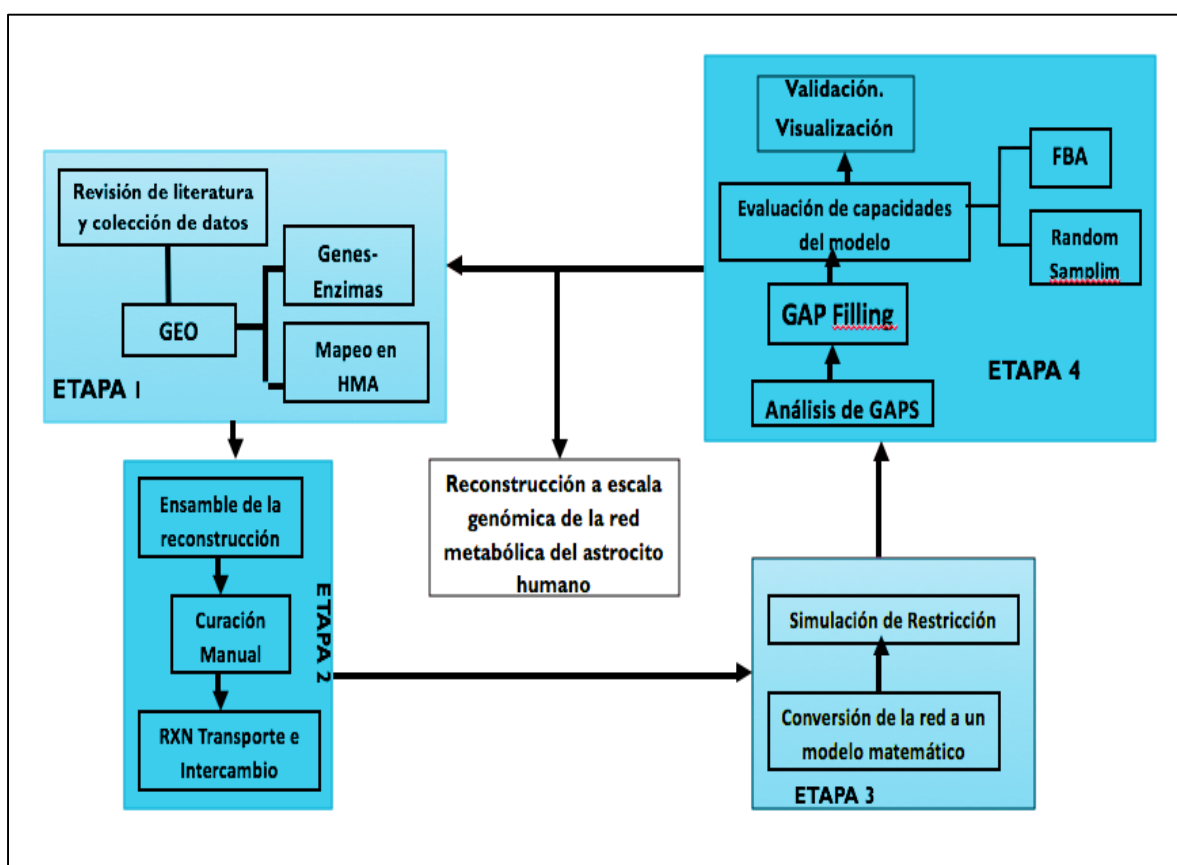


Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología seguida para la obtención y análisis de los modelos.

4.1 Etapa 1: creación de un borrador de la reconstrucción red metabólica (objetivo 1, 2 y 3)

En esta primera etapa consiste en la generación de un borrador basado en datos “ómicos” del astrocito y datos obtenidos de diferentes bases de datos.

4.1.1 Revisión de literatura y recolección de datos

Antes del inicio de la reconstrucción del modelo, se recolectó la mayor cantidad de la información disponible a nivel genómico, transcriptómico, bioquímico y fisiológico como especifica Baart y Martens [80]. La exhaustiva revisión de literatura permitió establecer la evidencia biológica que posteriormente fue usada como parámetro de restricción del modelo y como método para refinar, corregir y curar las reacciones presentes en el modelo.

4.1.2 Análisis bioinformático

Se realizó un análisis bioinformático de los datos transcriptómicos obtenidos de astrocitos corticales fetales humanos (GSE53404) [81]. Estos datos fueron descargados de la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) [82]. El análisis computacional permitió extrapolar y compilar los resultados del estudio transcriptómico. De esta forma, se generó un catálogo de enzimas específicas expresadas en el astrocito con sus correspondientes genes e identificadores de la Enzyme Commission (EC-number). Los EC-number de las enzimas fueron filtrados y asociados a la reconstrucción metabólica humana (HMA). La base de datos metabólica humana fue obtenida de BioModels Database [83] (MODEL1402200002) y fue usada como plantilla para la extracción de enzimas y

reacciones. Como resultado, se obtuvo la información sobre la asociación de las enzimas con las reacciones y las localizaciones sub-celulares.

4.2 Etapa 2: refinamiento manual y reconstrucción del modelo metabólico

Con el fin de garantizar la presencia de las diferentes enzimas en el astrocito humano y asegurar que la red global estuviera equilibrada en términos de masa y energía, la curación y la reconstrucción del actual modelo se logró en amplios pasos iterativos que se relacionan a continuación

4.2.1 Ensamblaje de la reconstrucción

El conjunto de 200 enzimas expresadas en astrocito con sus 3.864 reacciones asociadas y 112 vías metabólicas identificadas en los datos de expresión, fueron ensambladas manualmente una a una, empezando por las vías que jugaban un papel fundamental en las funciones cerebrales.

4.2.2 Curación manual del modelo metabólico

Se corrigieron inconsistencias de la red (estequiometría y reversibilidad de cada reacción) a través de una extensa búsqueda en las diferentes bases de datos y literatura [98] [99]. La base de datos Compartments [84] se utilizó para confirmar la presencia de cada enzima en los diferentes compartimentos como: espacio extracelular, citoplasma, mitocondrias, lisosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, peroxisomas y núcleo. De esta forma, se generó un modelo altamente conectado y consistente.

4.2.3 Reacciones de transporte e intercambio

Cuando una red multicompartimento es construida, es necesario incluir reacciones de transporte que simulen el movimiento de los metabolitos a través de los distintos

compartimentos. Las reacciones de transporte necesarias para satisfacer el adecuado flujo del modelo en las simulaciones, se adicionaron al modelo por medio de la construcción de un script (anexo 2) que permitió extraer las reacciones necesarias desde el HMA (human metabolic Atlas), esto permitió la entrada y salida de los diferentes metabolitos a través de los compartimentos del modelo.

Los metabolitos que por literatura se conoce que ingresan al interior del astrocito desde el ambiente extracelular se agregaron a la reconstrucción; esto con el fin, de garantizar el intercambio de los metabolitos a el interior del modelo. Algunas de las reacciones de intercambio se utilizaron para asegurar la disponibilidad de los metabolitos en el sistema (35 reacciones), estas no corresponden a las reacciones bioquímicas reales, solo se usaron para satisfacer las necesidades del modelo.

4.3 Etapa 3: conversión de la reconstrucción a un modelo matemático (objetivos 3, 4 y 5)

En esta etapa la reconstrucción fue convertida a un formato matemático (matriz estequiométrica). Las condiciones biológicas específicas del modelo de astrocito fueron definidas a través de las restricciones generadas por el ingreso de los diferentes metabolitos al modelo. Las variables contempladas se explican a continuación.

4.3.1 Conversión de la red a un modelo predictivo basado en restricciones

Para definir el espacio de flujo en estado estacionario se impusieron restricciones basadas en principios fisicoquímicos como: Coeficiente estequiométrico, direccionalidad y restricciones de entrada de los diferentes metabolitos. Todas las

reacciones de red del modelo se describieron matemáticamente y se ensamblaron en una matriz estequiométrica (S). Donde las restricciones al espacio de solución de flujos fueron dadas por los coeficientes estequiométricos de cada una de las reacciones, un resultado positivo significó la producción de los diferentes metabolitos y un resultado negativo implicaba su consumo en la reacción. [67].

Este modelo describe el comportamiento celular en condiciones de estado estacionario y el sistema de ecuaciones de balance de masa para todos los metabolitos, se representa como:

$$s * v = 0$$

$$s = m * n$$

Donde S es una matriz estequiométrica de tamaño m por n, m representa el número de metabolitos 5.007 y n el número de reacciones incluyendo las reacciones de intercambio 5.659, v es el vector de flujo reacción a ser identificado.

Las Restricciones para cada reacción tienen la forma:

$$V_i (\text{Limite inferior}) \leq V \leq V_a (\text{Limite superior})$$

Donde V_i y V_a están representados por los límites inferior y superior, que definen los flujos máximos y mínimos admisibles para cada reacción. Los límites superiores e inferiores de los vectores de las reacciones reversibles fueron delimitadas entre 1.000 y 1.000 como establece el protocolo de Palsson [11]. Las restricciones para las reacciones de intercambio se fijaron de acuerdo con la información disponible en la literatura, como se explicará más adelante (tabla 3).

La programación lineal se utilizó para encontrar un flujo que maximizara una función determinada, un enfoque a menudo referido como análisis de balance de flujo. Análisis de balance de flujo permitió comprobar que el modelo era factible en condiciones fisiológicas.

4.3.2 Simulación de restricciones

Condiciones fisiológicas normales: la condición fisiológica como se describe aquí, representa el metabolismo de un astrocito humano en el momento de la activación de la neurotransmisión excitatoria. Es decir, se simuló el comportamiento del astrocito en respuesta a los metabolitos producidos por una neurona glutamatérgica.

Para reducir el espacio de solución del modelo se aplicaron restricciones en base a la revisión exhaustiva de la literatura. Para este propósito, las tasas de flujos de entrada de los diferentes metabolitos desde el compartimiento extracelular a el astrocito, se especificaron de acuerdo a las necesidades metabólicas excitatoria del mismo. Se incluye glucosa, lactato, oxígeno, dióxido de carbono, amonio, aminoácidos, entre otros, como las sustancias a intercambiar en el modelo. El oxígeno y la glucosa son los principales sustratos que mantienen la actividad cerebral, normalmente entran en el espacio extracelular dependiendo del momento metabólico en el que se encuentre este órgano. Por tal motivo la disponibilidad de estos dos metabolitos se tuvo en cuenta para definir la condición fisiológica del astrocito. La literatura informa que las tasas de consumo de glucosa cerebral en un estado de actividad glutamatérgica son de 0,980 $\mu\text{mol/g}$ de tejido/min [85]. En cuanto a las tasas de captación de glucosa por los astrocitos,

se ha informado que la mitad de la glucosa que entra al cerebro es fosforilada en estas células (0,490 $\mu\text{mol/g}$ de tejido/min) [86].

Las tasas de absorción de oxígeno fueron calculadas en base a los resultados experimentales donde se informan que el 30% del oxígeno total en corteza cerebral es consumido por los astrocitos (0,530 $\mu\text{mol/g}$ de tejido/min) [92]. Todas las restricciones efectuadas sobre las reacciones de intercambio en la red se muestran en la tabla 3.

Condiciones isquémicas: El principal insulto al que está expuesto el astrocito durante el episodio isquémico es la pérdida de energía a causa de la disminución del flujo de los sustratos como la glucosa y el oxígeno. La isquemia se simuló en el modelo por medio de una reducción en el flujo de oxígeno y en el suministro de glucosa. La condición hipóxica se simuló mediante reducciones progresivas del 20% sobre la tasa máxima de consumo de oxígeno definido en condiciones fisiológicas (en un rango de 0-0,530 $\mu\text{mole/g}$ de tejido/min). Así mismo, la condición de privación de glucosa se generó por medio de disminuciones progresivas de 20% sobre la tasa máxima de consumo de glucosa definida en condiciones fisiológicas (en un rango de 0-0,490 de $\mu\text{mole/g}$ de tejido/min). Los ensayos de isquemia se realizaron utilizando un muestreo aleatorio uniforme.

4.4 Etapa 4: evaluación de la red (objetivos 3 y 4)

Esta etapa consistió en la verificación, evaluación y validación de la red metabólica del astrocito.

4.4.1 Análisis de gaps

Se realizó el análisis de los gaps en toda la red metabólica, identificando aquellos metabolitos dead end presentes en todo el modelo por medio del desarrollo de un segundo scrip (anexo 3). Un “dead end” es un metabolito que no puede ser producido o consumido por cualquiera de las reacciones que hacen parte de la red, estos generan fragmentos de la red aislados por falta de reacciones que los conecten.

4.4.2 Reacciones candidatas para gaps filling

Cada “dead end” fue examinado manualmente para identificar la posible reacción que resolvía la brecha de conexión. Para determinar el contexto metabólico en el cual se desenvolvía el dead end se realizó una búsqueda intensiva en la literatura y en distintas bases de datos como KEGG [98] (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), IntEnz (Integrated relational Enzyme database) y HMA [51] (Human metabolic atlas). Finalmente, los Gaps se resolvieron agregando reacciones que producían o consumían el metabolito problema. La presencia en el astrocito de las reacciones agregadas al modelo fue verificadas en HPD [99] (Human Protein Database). Esto con el fin de obtener un modelo altamente curado donde se asegurase que la presencia de cada reacción en el modelo estaba correctamente justificada.

Restricciones del astrocito en condiciones fisiológicas		
Metabolito	Tasa metabólica $\mu\text{mol/g/min}$	Referencias
Glucosa	0.16	[85] [86]
Linoleato	0.0011	[87]
Linolenato	0,0009	[87]
Histidina	0.0025	[88]
Isoleucina	0,0004	[89]
Leucina	0.0145	[35]
Lysina	0,011	[35]
Metionina	0.0017	[90]
Treonina	0.0008	[85]
Valina	0,0018	[91]
O₂	0,515-0,530	[92]
Co₂	0.530	[92]
Asparagina	0,0037	[93]
Tyrosina	0.0017	[93]
Arginina	0.0020	[94]
Glycina	0,0086	[95]
Prolina	0,0066	[92]
Serina	0,0016	[96]
Glutamato	0,232	[95]
Ornithina	0.0031	[96]
Acetoacetato	0,0015	[97]
Piruvato	0,007	[96]
Cistina	0.0045	[36]

Tabla 3. Tasas de flujo de los diferentes metabolitos de la red metabólica del astrocito. Todas las restricciones están configuradas bajo las siguientes unidades $\mu\text{mol/g/min}$.

A los metabolitos “dead end” no resueltos por inexistencia de información en la literatura, se les asignó un flujo de cero en la matriz estequiométrica; para de esta forma, asegurar que no interfiriera con la integridad y robustez de la red.

Reacciones artificiales fueron utilizadas con un par de metabolitos de la red, a estos metabolitos se les permitió entrar o salir de los diferentes compartimentos en los que estaban interactuando (núcleo, citoplasma, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, peroxisomas, lisosomas y mitocondrias al espacio extracelular). Esto sólo se utilizó cuando los mecanismos transportadores no conocen, y cuando su entrada o la eliminación del sistema era necesario para el funcionamiento del modelo.

4.4.3 Evaluación de las capacidades del modelo FBA

De acuerdo con Baart y Martens (2012) [80], el modelo puede ser evaluado bajo un estado estacionario. La evaluación de las capacidades de la reconstrucción permitió asegurar que el modelo representara con exactitud el sistema estudiado. Se utilizó el análisis de balance de flujo para predecir las capacidades metabólicas de la red del astrocito y para obtener una distribución de flujo óptimo. Para calcular las capacidades metabólicas del modelo reconstruido se utilizó el análisis de balance de flujo (FBA). El FBA es un método de optimización que permite establecer el conjunto de reacciones metabólicas más probables, que son utilizadas por un organismo bajo una condición biológica particular. Para esto, es necesario establecer una o un conjunto de reacciones conocida(s) como función objetivo (FO). El establecimiento de esta FO es fundamental para este tipo de

análisis, pues permite darle un curso específico al metabolismo, dentro de un contexto celular amplio [68].

4.4.4 Función objetivo

Se establecieron funciones objetivo en base a los datos obtenidos de la literatura sobre el metabolismo esencial de los astrocitos en respuesta a un estímulo excitatorio. Las dos funciones objetivo considerados para la red metabólica de astrocitos se enumeran en la tabla 4. Estas se explican debido a que según la literatura el metabolismo del astrocito funciona principalmente utilizando ATP derivado de la glucólisis completa, por esta razón, la primera función objetivo describe la síntesis de ATP. La segunda función objetivo fue una reacción metabólica que simula el intercambio de glutamato y glutamina entre astrocitos y espacio extracelular. Estos metabolitos se incluyeron en la función objetivo por el papel relevante que cumplen en el metabolismo astrocitario.

Función metabólica	Ecuación
Producción de ATP	$\text{ADP [m]} + 4 \text{ H}^+ [\text{c}] + \text{Pi [m]} \Rightarrow \text{ATP [m]}$ $+ 3 \text{ H}^+ [\text{m}] + \text{H}_2\text{O [m]}$
Maximización de glutamato-glutamina	$\text{glutamate [x]} + \text{glutamine [c]} \Rightarrow$ $\text{glutamate [c]} + \text{glutamine [x]}$

Tabla 4. Funciones objetivo metabólicas usadas en el análisis de la red de astrocito. Se indica el compartimento donde ocurre cada reacción. [m] mitocondria [c] citosol y [x] espacio extracelular.

4.4.5 Muestreo del espacio de flujo en un modelo en estado estacionario (Random Sampling)

El muestreo aleatorio del espacio de flujo es una aproximación desarrollada recientemente dentro del marco del modelamiento basado en restricciones. Este método fue usado para definir y limitar el espacio de solución del modelo, el cual está compuesto por un conjunto de soluciones factibles que satisfacen las restricciones impuestas [100]. Las restricciones impuestas al espacio de solución fueron dadas por la estequiometría, la reversibilidad y las mediciones experimentales de flujo nombradas anteriormente. El espacio de flujo se definió a partir del algoritmo “Random Sampling” implementado en RAVEN (Reconstruction, Analysis and Visualization of Metabolic Networks) [114]. Este algoritmo encierra la región de soluciones permitidas en un paralelepípedo con las mismas dimensiones del espacio de soluciones (espacio de la matriz estequiométrica) de esta manera genera puntos al azar en las esquinas del paralelepípedo que se encuentran en una zona de posible solución. Se realizaron cinco mil (n) muestreos para cada par de condiciones consideradas (estado fisiológico normal, por ejemplo vs. estado isquémico).

Los valores de las medidas de flujos fueron diferentes en las simulaciones de estas dos condiciones, para calcular la diferencia entre los flujos y para cuantificar la importancia del cambio de cada flujo se utilizó una aproximación basada en el puntaje Z. Para obtener el puntaje Z se obtuvieron las medias y desviaciones estándar de cada flujo en cada una de las condiciones. El Z-score es igual a la diferencia entre las medias de cada una de las condiciones dividido por la desviación estándar de esta diferencia.

$$Z_{iFlujo} = \frac{E2(V_i) - E1(V_i)}{\sqrt{Var2(V_i) + Var1(V_i)}}$$

La diferencia entre el promedio en el numerador sigue una distribución normal (de acuerdo con el teorema del límite central) con una desviación estándar igual a la desviación estándar del flujo (el denominador) dividido por la raíz cuadrada del número de muestras. Por lo tanto, en sí Z sigue una distribución normal con una desviación estándar igual a la inversa de la raíz cuadrada del número de muestras, para mantener el error más bajo que 0,15 se realizaron cinco mil simulaciones lo que redujo la probabilidad de error al 0.999%.

En la red se pueden encontrar “loops” que son reacciones cíclicas que se pueden repetir en forma infinita. Las reacciones y metabolitos, involucrados en Loops fueron descartados del análisis ya que estas reacciones pueden generar valores de flujo arbitrario.

4.4.6 Visualización de las redes metabólicas y flujos

Para observar los resultados de FBA en las redes metabólicas se empleó la herramienta CyFluxViz implementada en MATLAB para generar los archivos necesarios para la visualización de las redes en Cytoscape v2.8.0

4.4.7 Validación de resultados. (Objetivo 6)

Los cambios metabólicos observados en los modelos fueron comparados contra reportes de literatura mediante una revisión bibliográfica extensa en bases de datos como OMIN, HMDB, literatura en NCBI y GoPubMed.

5. RESULTADOS

Los resultados que a continuación se presentan derivaron de un proceso extenso de revisión manual. Como resultado se obtuvo una lista de reacciones metabólicas robusta y altamente enriquecida a partir de datos “ómicos” y bioquímicos obtenidos de la literatura. De esta forma se puede asegurar que los resultados han sido correctamente organizados y extensamente curados. El modelo matemático de astrocito construido asume un estado estacionario y permitirá el estudio de varias condiciones fisiológicas y patológicas en el astrocito; ya que posee una gran cantidad de vías metabólicas que más adelante serán especificadas (figura 8).

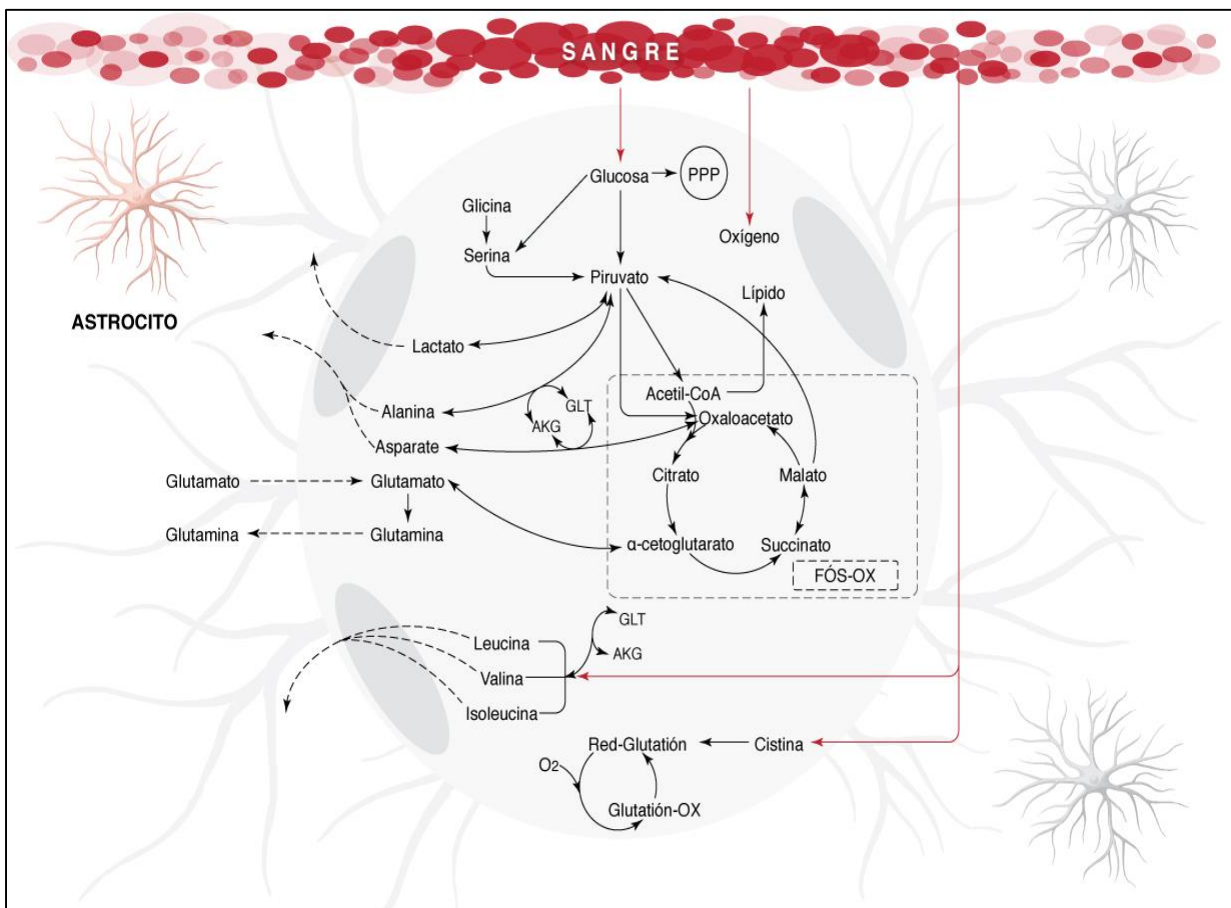


Figura 8. Representación esquemática de las principales rutas metabólicas en la reconstrucción del astrocito humano.

5.1 Características de la red metabólica de astrocito

Se encontró que la red de astrocito contiene 3.765 genes, 862 enzimas, 5.007 metabolitos y 5.659 reacciones de las cuales 237 son reacciones de intercambio y 1.948 son reacciones de transporte. La distribución del número de genes, reacciones y metabolitos en los diferentes compartimentos se puede observar en la tabla 5.

Para motivos de comprensión de la estructura del modelo, este se puede organizar en las siguientes cuatro categorías: (1) clasificación enzimática (EC-number); (2) asociación a genes; (3) localizaciones subcelulares y (4) vías metabólicas.

Con respecto a la organización de las proteínas en el modelo (EC-number), se observó que el 35% del total de las reacciones en el modelo estaban mediadas por enzimas clasificadas como transferasas. Este conjunto de enzimas cataliza la transferencia de grupos funcionales específicos (transferencia de grupos amino, carboxilo, carbonilo, metilo, glicosilo, acilo, o fosforilo) de un sustrato a otro. Estas son fundamentales para el correcto funcionamiento metabólico del astrocito por lo tanto se encuentran interviniendo en una gran parte de las reacciones contempladas en el modelo. El siguiente grupo de enzimas con una gran intervención en el modelo fueron las oxidorreductasas (28%). Seguido por proteínas de transporte de membrana clasificadas mediante enzimas asociadas a hidrolasas (20%), ligasas (8%), liasas (6%) e isomerasas (3%); (Figura 9A).

Composición de la red metabólica de astrocito por compartimentos			
	No. Genes	No. Reacciones	No. Metabolitos
Espacio extracelular	315	1190	461
Peroxisoma	187	381	353
Mitocondria	668	923	677
Citosol	2756	1604	2251
Lysosoma	102	429	378
E. retículo	369	591	530
A. Golgi	191	182	275
Núcleo	104	118	67
Límites	0	0	18

Tabla 5. Sumario de la composición de la red metabólica de astrocito por compartimentos.

Las reacciones también se pueden clasificar sobre la base de su asociación con los genes. El 58% de las reacciones modelo estaban asociadas a genes. Los genes contemplados en el modelo están asociados a una amplia gama de enfermedades neurológicas. El resto de las reacciones no estaban asociadas ningún gen y fueron clasificados como: reacciones de intercambio no asociadas a gen (30%), reacciones de transporte no asociadas a gen (9%) y reacciones intracelulares no asociadas a gen (3%); (Figura 9B).

Las reacciones citosólicas y mitocondrial contribuyeron con un 59% de las reacciones totales en el modelo. El 23% de las reacciones pertenecía al

peroxisoma, lisosoma, retículo endoplasmático, aparato de Golgi y el núcleo. Las reacciones de transporte entre los diferentes orgánulos y el espacio extracelular representaron al 18% de las reacciones totales (Figura 9C).

La reconstrucción está compuesta por varias rutas metabólicas que han derivado del análisis computacional del estudio transcriptómico y de la extrapolación de los datos a un set de reacciones del metabolismo humano. (Figura 9D)

El 3,0% de las reacciones encontradas en el modelo hacen parte de la glucólisis, de la vía pentosa fosfato (PPP), del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y de la fosforilación oxidativa. Se incluyeron dentro de estas vías metabólicas las reacciones anapleróticas mapeadas específicamente en el astrocito (obtenidas en el estudio transcriptómico). Así, se aseguró que en la reconstrucción se encontraran reacciones que proporcionaran intermediarios del ciclo de TCA, para sustituir aquellos disminuidos como resultado de la síntesis y consumo de neurotransmisores (función objetivo del modelo). Dentro de este grupo de vías metabólicas se incluyeron también las reacciones mapeadas de consumo de ATP por parte de las ATPasas. Así mismo considero la producción y liberación de lactato a el espacio extracelular.

En cuanto a los aminoácidos, la reconstrucción contempla reacciones de entrada de alanina y sodio conjuntamente desde el espacio extracelular al citosol. En el modelo la alanina junto con el alfa-cetoglutarato son transformados a piruvato y glutamato a través de la enzima alanina transaminasa (EC:2.6.1.2).

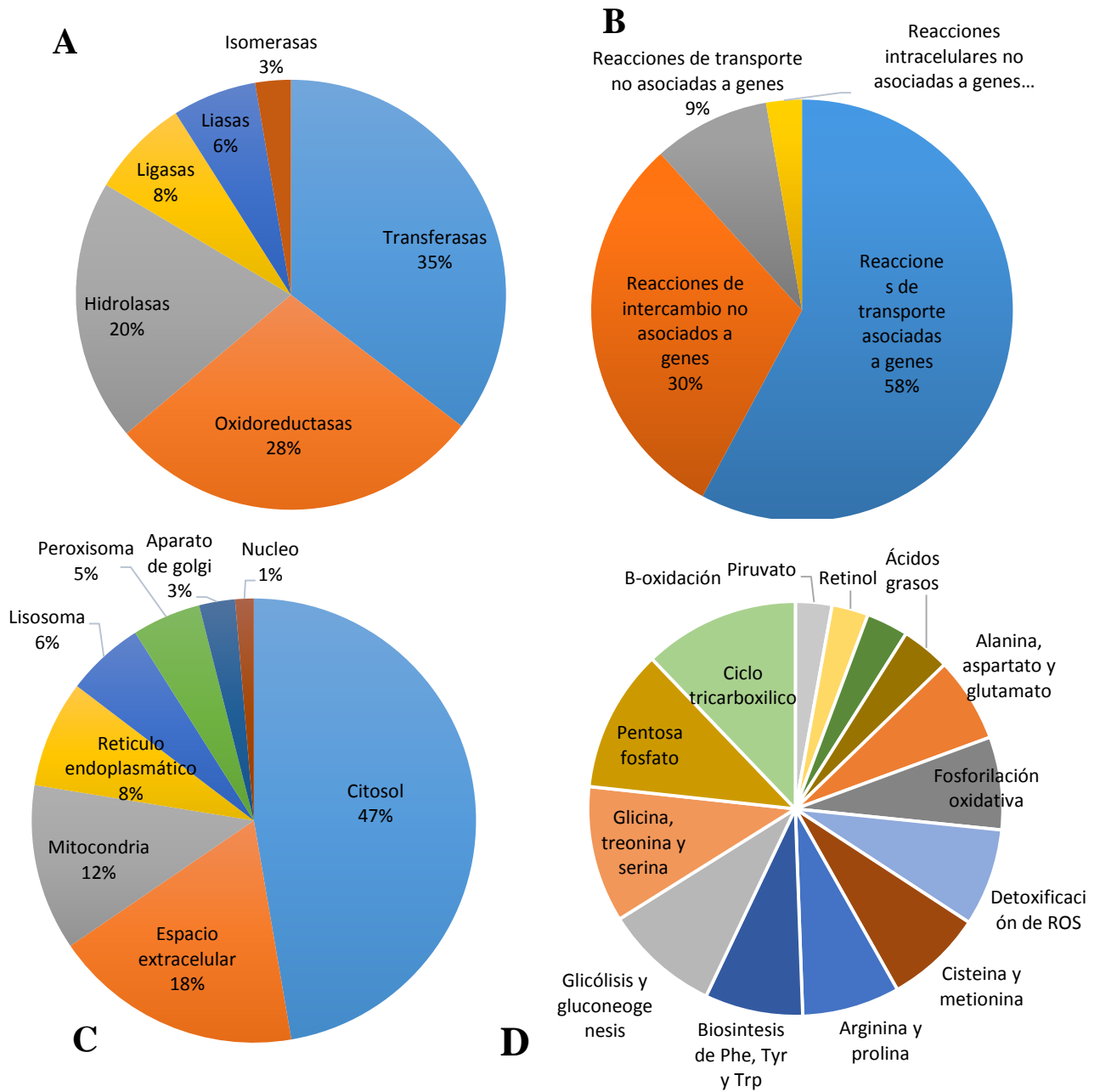


Figura 9. Clasificación de las propiedades de la reconstrucción del modelo metabólico del astrocito. La reconstrucción del modelo metabólico ha sido clasificada en A: EC- número B. Reacciones con asociación o no a diferentes genes C. Compartimentos celulares D. Muestra las principales rutas metabólicas encontradas en el modelo.

El aspartato puede ser formado en una reacción reversible vía transaminación, para ser transferido a el espacio extracelular o para ser tomado del mismo. La glicina y la serina pueden entrar y salir del modelo por medio de reacciones de transporte específicas. La serina también puede convertirse en glicina y en piruvato a través de dos reacciones que involucran diferentes sustratos.

El 21,8% de las reacciones del modelo pertenecía al metabolismo de los ácidos grasos, la biosíntesis del colesterol y beta oxidación. Estos ciclos son críticos debido a que los astrocitos son casi la única población de células en el cerebro que podrían oxidar ácidos grasos y producir colesterol. El Acetil-Coa es el precursor de la síntesis de lípidos e interviene un gran número de vías metabólicas, es un compuesto clave entre la glucólisis, el ciclo de Krebs, y la Beta oxidación. El modelo contiene tres principales lípidos estos son: triacilgliceroles, el colesterol y los fosfolípidos. En cuanto al colesterol, este es producido por síntesis local en los astrocitos y exportado a el espacio extracelular. Los bloques de construcción de los fosfolípidos son los ácidos grasos los cuales son sintetizados a partir del Acetil-CoA (Acetil coenzima A) en el citosol. La síntesis de los fosfolípidos se realiza a partir del glicerol 3 fosfato y los ácidos grasos el cual es producto de una reacción de deshidrogenación. La carnitina y los ácidos grasos pueden ingresar a el modelo desde el espacio extracelular. Los ácidos grasos no esenciales (palmitato, oleato, estearato) son sintetizados propiamente en el modelo de astrocito; aunque, el palmitato también puede ser tomado del exterior.

Para la producción de araquidonato y decosahexenoato se requiere la absorción de los ácidos grasos esenciales linoleato y linolenato respectivamente, estos son

proporcionados desde el exterior a la célula. El ácido araquidónico es el sustrato para la producción de muchos compuestos biológicamente activos, incluyendo las prostaglandinas, ácidos hidroxieicosatetraenoico, leucotrienos, y lipoxinas todos incluidos en el modelo.

El cerebro requiere glutatión para remover las especies reactivas de oxígeno (ROS). El glutatión es sintetizado de la cisteína la cual es derivada de la cistina, los astrocitos son los únicos que pueden tomar cistina de los vasos sanguíneos y convertirlos a cisteína. El modelo posee la maquinaria para remover los peróxidos que se pueden formar en el sistema. Estos son removidos por el glutatión el cual se oxida y es convertido de nuevo a glutatión reducido por la glutatión reductasa (EC 1.8.1.7) la cual requiere NADPH para su correcto funcionamiento. Hay otro conjunto de reacciones que no se asignaron a ninguna vía en particular, se clasificaron como “miselánea” que contribuyó al 0,2% de las reacciones. El conjunto completo de vías de modelo de astrocitos se encuentra en los datos suplementarios 1.

5.2 Evaluación de capacidades del modelo: análisis de balance de flujos

La validación de las capacidades de la reconstrucción metabólica permitió asegurar que el modelo representara correctamente el sistema estudiado. De esta manera, para predecir las capacidades metabólicas de la red y para evaluar las distribuciones de flujo óptimo del modelo de astrocito se utilizó el análisis de balance de flujo. En este sentido, este algoritmo permitió evaluar los intervalos

óptimos que respondían a el estado simulado donde el modelo representó correctamente el comportamiento metabólico del astrocito.

Las capacidades de la red reconstruida se calcularon a través de dos funciones objetivas que evaluaron la respuesta de la red y capturaron escenarios metabólicos desarrollados en los astrocitos tales como: la maximización de la producción de ATP, la absorción de glutamato y la secreción de glutamina. La función objetivo de maximización del ATP en el astrocito se eligió debido a que las células tienden a maximizar la síntesis de ATP o utilizar de manera óptima los metabolitos del entorno para satisfacer la demanda celular. La entrada de glutamato y salida de glutamina se escogió, teniendo en cuenta el rol principal que cumple el astrocito en la detoxificación del glutamato del medio extracelular para su posterior conversión a glutamina.

Las distintas funciones metabólicas permitieron calcular distribuciones de flujo óptimas que satisfacían las funciones metabólicas a estudiar. Por lo tanto, los resultados que a continuación se presentan son generados a partir de las distribuciones de flujo que se ajustaron a el comportamiento metabólico del astrocito humano en respuesta a máximos requerimientos de ATP, a la captación de glutamato y posterior de glutamina. En la figura 10 se observan las distintas rutas metabólicas activas en las simulaciones realizadas.

5.3 Metabolismo energético

Las diferentes simulaciones permitieron distribuir el espacio de flujo en pro de generar una máxima obtención de ATP. En este sentido el modelo permitió evidenciar un mayor flujo en la captación de oxígeno y glucosa. La glucosa se

metabolizó principalmente por vía de la glucólisis, acoplada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, al ciclo de las pentosas fosfato y la fosforilación oxidativa. Los flujos metabólicos a través de estas vías se activaron significativamente en las simulaciones realizadas.

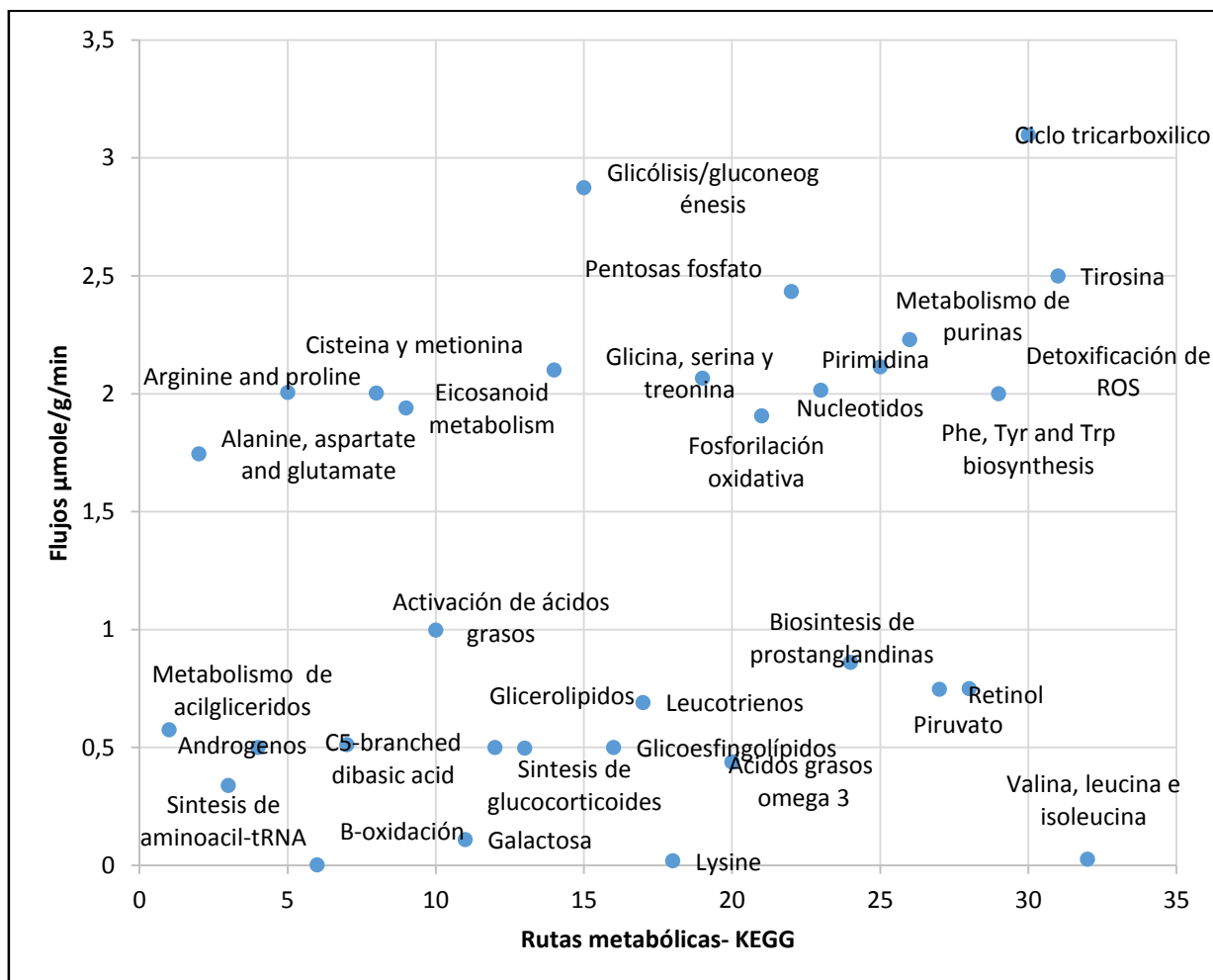


Figura 10. Vista general de los flujos activados en la red metabólica en respuesta a la simulación con las funciones objetivo. En el eje x se ubican las vías metabólicas organizadas por orden alfabético.

La glucólisis es la vía metabólica encargada de oxidar la glucosa para así obtener energía para la célula. En ese sentido la tasa de flujo a través de la reacción mediada por la enzima hexoquinasa principal moduladora de la reacción de fosforilación de la glucosa a glucosa 6 fosfato se calculó en 0,49 $\mu\text{mol/g/min}$, este valor es acorde a los valores establecidos experimentalmente [88]. La activación en el flujo de esta reacción aseguró el flujo vía arriba y permitió usar el producto de la reacción como sustrato en varios procesos.

Se observó la activación de las reacciones encargadas de la producción de piruvato mediada por piruvato quinasa (EC:2.7.1.40). En consecuencia, se activó la producción de ATP y de nicotinamida adenina dinucleotido (NAD^+), este último esencial para mantener un continuo flujo glucolítico. El flujo a través de lactato deshidrogenasa, enzima que cataliza la reducción de piruvato y NADH a lactato y NAD^+ se estimó en 0,99 $\mu\text{mole/g/min}$ [88]. Así mismo, el valor del flujo en la reacción de salida de lactato a el espacio extracelular fue de 0,98 $\mu\text{mole/g/min}$ aproximadamente [92].

La comparación de las proporciones de flujo de entrada de glucosa y producción final de piruvato en el modelo, corresponde a lo reportado experimentalmente por metodologías de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de C^{13} . Donde, una molécula de glucosa produce dos de piruvato.

Bajo condiciones aeróbicas, el piruvato producido también puede ser metabolizado vía ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Así, esta vía realiza la oxidación de glúcidos, ácidos grasos, aminoácidos y produce CO_2 . El resultado de este ciclo es la liberación de energía en forma utilizable (poder reductor y GTP). En las simulaciones realizadas el ciclo de los ácidos tricarboxílicos presentó más

actividad de flujo en las diferentes reacciones con respecto a la glucólisis. Analizando detalladamente el TCA, se observó una primera activación a nivel de la enzima citrato sintasa (EC:2.3.3.1). Esta enzima, cataliza la primera la reacción de condensación del acetato, proveniente del acetil-CoA y del oxalacetato. Como consecuencia de la unión entre las dos moléculas, el grupo tioéster (CoA) se hidroliza, formando así la molécula de citrato. Posteriormente se activó el flujo a través los intermediarios metabólicos y diferentes enzimas del ciclo tricarboxílico. El flujo a través de la reacción de oxidación de succinato a fumarato mediada por la enzima succinato deshidrogenasa (EC:1.3.5.1) se calculó en 0,06 $\mu\text{mol/g/min}$ lo cual es consistente con los estudios realizados por Amaral et. al [88].

La activación de flujos a través de las reacciones implicadas en el desarrollo de la vía de la fosforilación oxidativa, permitió oxidar el NADH resultante del ciclo tricarboxílicos para generar ATP. La fosforilación oxidativa produce una pequeña proporción de especies reactivas del oxígeno, tales como superóxido y peróxido de hidrógeno por tal motivo se observa activación en el flujo de las reacciones detoxificadoras de ROS [101].

La vía pentosa fosfato convierte nicotinamida dinucleótido fosfato de adenina oxidada (NADP⁺) a nicotinamida dinucleótido fosfato de adenina en su forma reducida (NADPH) [102]. Este último es un agente reductor que participa en reacciones biosintéticas reductoras, tales como los lípidos y la síntesis de esteroides, y en la producción de la forma reducida de glutatión y tiorredoxina. El glutatión y la tiorredoxina son cofactores para las enzimas glutatión peroxidasa y peroxirredoxinas respectivamente, ambos de los cuales limpian hidroperóxidos, combatiendo de este modo el estrés oxidativo [103].

Los presentes resultados del modelo, sugieren una activación en el flujo de alrededor de la vía de las pentosas fosfato con una posterior producción de NADPH, el cual podría servir como dador de electrones en las reacciones reductoras de biosíntesis de componentes o usado en la detoxificación de peróxidos de hidrógeno y el mantenimiento del glutatión en su forma reducida.

5.4 Ciclo de glutamato y glutamina

Una de las funciones mejor caracterizadas de los astrocitos es la rápida eliminación de los neurotransmisores liberados en la hendidura sináptica, un proceso esencial para la terminación de la transmisión y el mantenimiento de la excitabilidad neuronal sináptica [104]. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro y es especialmente crítico por sus propiedades neurotóxicas. En condiciones fisiológicas, el glutamato captado por las células se puede utilizar para los propósitos metabólicos (síntesis de proteínas, el metabolismo energético, la fijación amoníaco) o reutilizarse como transmisor. El efecto del glutamato como neurotransmisor en la sinapsis depende en su mayoría del astrocito [21].

Se evaluaron las capacidades del modelo, a través del ciclo de glutamato-glutamina, mediante el uso de la función objetivo y la fijación de tasas netas de entrada de glutamato al sistema desde el espacio extracelular (variando la captación de glutamato de 0,0003 a 0,335 $\mu\text{mol/g/min}$). Como resultado de la simulación, el flujo en la glutamina sintetasa aumentó (EC:6.3.1.2) catalizando la condensación del glutamato y el amoníaco para formar glutamina. Se evaluaron los flujos de la reacción de conversión de alfa-cetoglutarato a glutamato donde

interviene la enzima glutamato deshidrogenasa (EC:1.4.1.3). Se observó que el aumento en la entrada del glutamato desde el espacio extracelular activó los flujos a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El exceso de glutamato en el sistema puede provocar que este se degrade oxidativamente. Después de la conversión a α -cetoglutarato, este puede ser metabolizado a través del ciclo del ácido tricarboxílico a succinato, fumarato y malato, sucesivamente o puede ser descarboxilado a piruvato para luego ser reducida a lactato (Figura 11).

En respuesta a la captación de glutamato, se aumentó el flujo en las reacciones de intercambio de glucosa. Los flujos en la glicólisis, la producción y liberación de lactato se aumentaron a medida que aumentaban los niveles de glutamato.

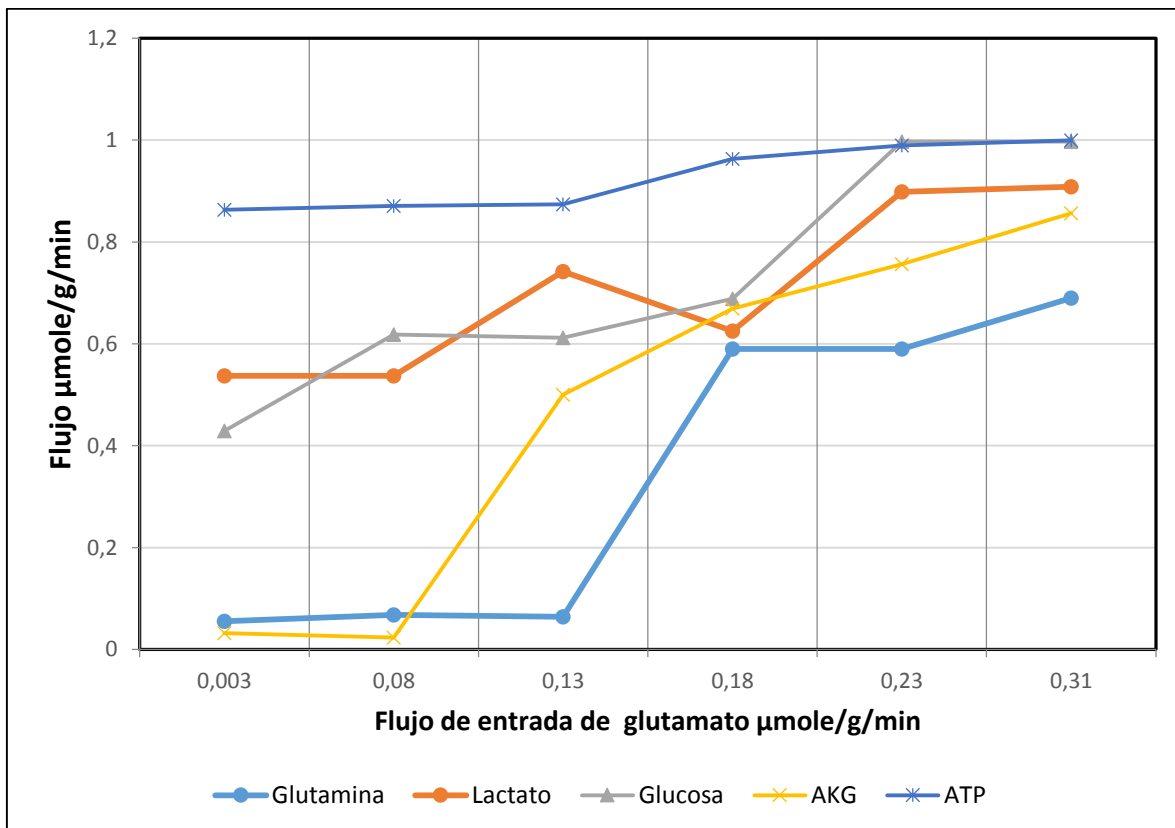


Figura 11. Comportamiento de los flujos metabólicos de los metabolitos (glutamina, AKG, glucosa, lactato y ATP) en respuesta a la captación de glutamato a diferentes niveles de flujo.

De esta manera, la mayor captación de glucosa con la consiguiente activación de flujos a nivel de la vía metabólica de la glucólisis compensarían los requerimientos energéticos que involucra la captación de glutamato y la producción de lactato. Esto explica porque durante simulación se observó un aumento en la captación de glucosa, lactato, glutamina y la producción de AKG proporcional con el incremento de glutamato (variando la captación de glutamato de 0,0003 a 0,335 $\mu\text{mol/g/min}$). También el aumento en la captación de glutamato generó un moderado incremento en el flujo de la síntesis de ATP. La disminución en la captación de glutamato no afectó notablemente la síntesis de ATP. La razón probable de esto puede ser el reciclaje de piruvato a partir de los intermediarios del ciclo TCA. Así mismo, la reducción de la captación de glutamato se correlacionó con una disminución en el flujo metabólico de la glutamina sintetasa, glutamato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa. La simulación sugirió que el glutamato también puede ser metabolizado a partir de diferentes vías. Las distribuciones de flujo del modelo están de acuerdo con la literatura.

5.5 Metabolismo lipídico

Se estimó recientemente que alrededor del 20% de los gastos totales de energía del cerebro adulto se satisface mediante la oxidación de ácidos grasos. Se cree que la oxidación de ácidos grasos se produce casi exclusivamente en los astrocitos. Simulaciones con las distintas funciones objetivo demostraron un pequeño aumento en el flujo a través de la beta oxidación y la oxidación de ácidos grasos, lo que indica que la síntesis de lípidos en condiciones de estado

estacionario es posible en astrocitos. La figura 12 muestra de las vías activas durante la simulación.

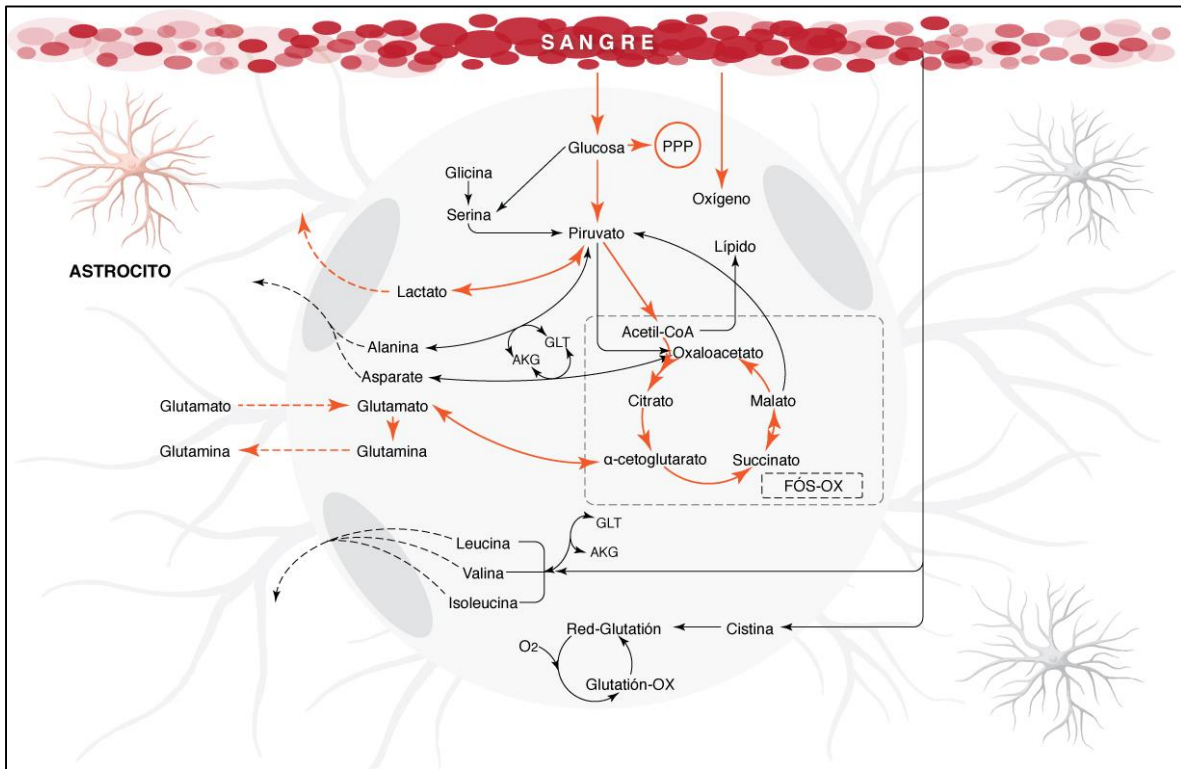


Figura 12. Interacciones metabólicas en el astrocito. Se muestran las rutas activas del modelo en la simulación. Las líneas punteadas muestran los metabolitos que se intercambian en el modelo.

Las líneas naranjas indican las vías que presentaron más flujo durante la simulación.

5.6 Potencial del modelo reconstruido en el análisis de estados patológicos.

La aproximación del modelamiento matemático bajo restricciones puede ayudar a comprender los cambios metabólicos que se presentan en diferentes patologías. La isquemia es un problema de salud pública y de acuerdo con la organización mundial de la salud se ha constituido como una de las primeras causas globales

de muerte [105]. Dada la importancia de esta patología se escogió simular los efectos de la isquemia en el sistema metabólico del astrocito humano. Adicionalmente, el modelo contaba con los metabolitos necesarios para simular una influencia isquémica en el sistema metabólico de astrocito.

De esta manera, para simular en la red metabólica una condición isquémica, el flujo de oxígeno y la glucosa se redujo gradualmente en pequeños intervalos del 20% sobre el valor normal encontrado en la literatura. Las distribuciones de flujo a través de la red se calcularon utilizando muestreo de Monte Carlo (Random Sampling). Se tomaron datos experimentales del flujo por las diversas vías metabólicas en cultivos de astrocitos expuestos a privación de oxígeno y glucosa. Esto permitió limitar el espacio de flujo de la simulación, de esta manera los valores de flujo que se generaron fueron más exactos y que permitieron caracterizar una distribución de flujo factible para el estado metabólico de isquémica en los astrocitos.

5.6.1 Condiciones isquémicas

La isquemia cerebral se produce a raíz de un paro cardíaco, accidente cerebrovascular o traumatismo craneal. Esta condición puede causar daño cerebral severo y es la principal causa de muerte y discapacidad a largo plazo. El insulto primario al cual están expuestas las células cerebrales, es la disminución en el suministro de los sustratos como la glucosa y el oxígeno. Las células del cerebro requieren un suministro continuo de oxígeno y sustratos energéticos para el mantenimiento de su integridad funcional y estructural [38,106].

Los astrocitos tienen diversas e importantes funciones en muchos aspectos del daño cerebral isquémico, ya que pueden defender a las neuronas contra varios

insultos metabólicos [107]. La supervivencia neuronal durante y después de la isquemia cerebral depende en gran parte del correcto funcionamiento de los astrocitos. De esta forma, la disfunción astrocítica puede conducir a una alteración de la homeostasis normal entre neurona-astrocito generando cambios metabólicos con la consecuente muerte celular. Así, la isquemia es un ejemplo, en el cual los astrocitos parecen jugar un “papel paradójico” en la supervivencia neuronal [44].

Las distribuciones de flujo calculadas en condiciones isquémicas se compararon contra las distribuciones calculadas en el estado fisiológico de neurotransmisión glutamatérgica. El resultado a nivel global, demostró un aumento significativo en la tendencia del flujo a través de la glucólisis anaeróbica y vía pentosa fosfato. Así mismo, se presentó disminución en el flujo de las reacciones agrupadas en las rutas metabólicas de la oxidación de ácidos grasos, ciclo de ácido tricarboxílicos, fosforilación oxidativa, ciclo de glutamato-glutamina y $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$. (Figura 13).

Al evaluar el comportamiento del lactato en el modelo, se observa un gran incremento del flujo en las reacciones que involucran la producción del mismo. Este fenómeno bioquímico se observa debido a la activación de la vía anaeróbica glucolítica y a la inactivación parcial de ciclo de TCA que ocurre en la mitocondria del modelo. La mitocondria es la principal fuente de generación de ATP a nivel celular y depende en su mayoría de la disponibilidad del oxígeno, por lo que este metabolito es esencial e insustituible especialmente en estos orgánulos [108]. La falla en la captación de oxígeno reduce gravemente la producción celular de ATP y de otros metabolitos altamente energéticos [109]. Al evaluar las diferentes reacciones llevadas a cabo en la mitocondria se observa una disminución importante a nivel de los flujos de las reacciones enmarcadas en el ciclo de Krebs.

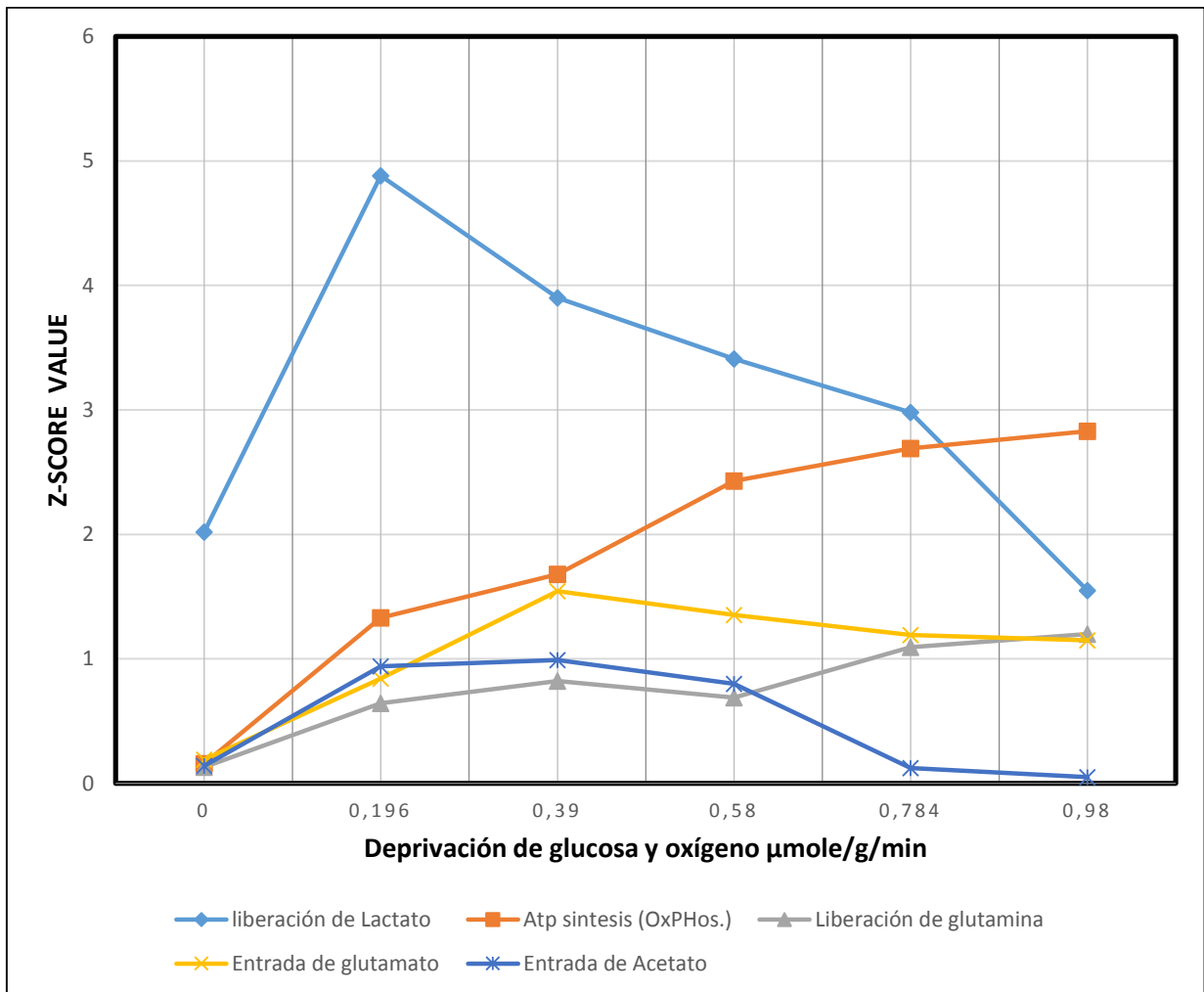


Figura 13. Cambios en el flujo de lactato, glutamato síntesis de ATP, glutamina y acetato en respuesta a la simulación de isquemia en el modelo matemático de astrocito.

Con referencia a la glucólisis y su relación con la disminución de sustratos como el oxígeno y glucosa, varios estudios experimentales han reportado un aumento en la actividad de esta ruta metabólica como respuesta de la célula a un estado isquémico, este mecanismo es adoptado por la célula para mantener los niveles de ATP estables y proteger el sistema biológico [109,94]. Se evaluó el comportamiento de las reacciones de glucólisis en la red reconstruida, las

simulaciones muestran que a pesar del incremento del flujo en la glucólisis la producción de ATP disminuye notablemente. Esto es debido a que se ve comprometido el balance de energía de la célula a causa de la reducción en el metabolismo oxidativo de la glucosa y a la disminución de sustratos necesarios para la producción de ATP (oxígeno y glucosa).

Un acontecimiento fundamental en la isquemia cerebral es la disfunción de la bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ a causa de la disminución del ATP celular. La inhibición de esta bomba durante la isquemia causa una pérdida de los gradientes iónicos celulares [97]. En ese sentido, la simulación mostró que el flujo de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ disminuyó proporcionalmente con la disminución de ATP. Por otro lado, la privación de glucosa y oxígeno condujeron a la disminución en el flujo de la captación de glutamato en la reconstrucción. Como era de esperar, el flujo de captación de glutamato cae a niveles mucho más bajos durante una depleción severa de ATP. Lo que indica que la internalización del glutamato a la célula, está mediado directamente por requerimientos energéticos.

Ciertos intermediarios metabólicos, en circunstancias isquémicas, pueden reemplazar la glucosa y actuar como sustratos de energía alternativas [97]. Un ejemplo de esto, es el acetato el cual es un sustrato alternativo que solamente se transporta a las células gliales, este entra en el ciclo TCA directamente al nivel del citrato [106]. Se evaluó la captación de acetato en el modelo El flujo de absorción del acetato aumentó en respuesta a la disminución en el oxígeno y la glucosa.

En general, los cambios observados en las distribuciones de flujo de la red son similares a los cambios reportados experimentalmente en ensayos realizados en

6. *Discusión*

Este trabajo presenta la más completa reconstrucción y caracterización de la red metabólica del astrocito, construida en base a datos transcriptómicos y bibliómicos. La reconstrucción incluye las rutas centrales del metabolismo de carbohidratos, el metabolismo energético, el metabolismo de purinas, el metabolismo de aminoácidos, el metabolismo de cofactores y vitaminas, el bien conocido ciclo de glutamato glutamina, el metabolismo de lípidos y finalmente el metabolismo del glutatión. Por lo tanto, esta reconstrucción simula el comportamiento metabólico global del astrocito; ya que comprende rutas consideradas por primera vez.

Este enfoque *in-silico* fue capaz de producir resultados que corresponden a lo reportado experimentalmente; asimismo, el modelo permitió comprender de una manera global las propiedades de la red en estados fisiológicos (activación glutamatérgica) y patológicos (privación de glucosa y oxígeno).

Datos experimentales de resonancia magnética nuclear han sugerido que los astrocitos presentan una alta tasa de flujo a nivel de la glucólisis por lo que son considerados como “glucolíticos”. Los estudios indican que estas células prefieren la producción y liberación de lactato al espacio extracelular sobre la entrada de piruvato al ciclo de los ácidos tricarboxílicos; pero las contribuciones relativas de la glucólisis, TCA y fosforilación oxidativa siguen siendo un tema de debate. Debido a que el astrocito pueden presentar múltiples estados metabólicos, los cuales pueden variar en respuesta a estímulos externos; por tal motivo a nivel

experimental se pueden encontrar resultados contradictorios en la medición de flujos de las distintas vías metabólicas activas en el astrocito.

Nuestros hallazgos apoyan la activación de flujos glucolíticos en respuesta a una demanda de energía abrupta (respuesta condición de excitación neuronal glutamatérgica); pero también confirman que ante una condición excitatoria glutamatérgica se presenta un aumento significativo en la activación de las reacciones pertenecientes a las vías metabólicas de la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la vía de las pentosas fosfato y la fosforilación oxidativa.

A nivel de flujos, se observó una mayor actividad en la vía de los ácidos tricarboxílicos seguido por glucólisis, vía pentosas fosfato y por último fosforilación oxidativa mostrando relaciones directas entre estos diferentes ciclos. De esta forma, las distribuciones de los flujos en las simulaciones podrían estar relacionadas con las tareas metabólicas fijadas en el modelo donde se simula un estado celular excitatorio; en ese sentido, el modelo respondió maximizando la producción de energía en respuesta a los requerimientos generados por la entrada de glutamato.

Al fijar la función objetivo se exigió a el modelo trabajar para generar la máxima producción energética en el sistema; de esta manera, se activaron aquellas vías que generan un aumento en la producción de energía . Por lo tanto, se observan flujos en las vías productoras de sustratos energéticos como por ejemplo el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la glucolisis. En ese sentido, se confirmó que el modelo podía responder con la maquinaria metabólica que posee para producir ATP, mostrando gran actividad oxidativa y aumentando el consumo de los sustratos energéticos. Se han realizado varios estudios que validan nuestros

resultados. Por ejemplo, Wong-Riley [110] estimó que los astrocitos contienen aproximadamente el cinco por ciento de las mitocondrias cerebrales totales. Lovatt et al. [111] usando el análisis de microarrays mostraron que los astrocitos expresan transcritos que predicen autosuficiencia tanto en la glicólisis como en el metabolismo oxidativo. Es importante destacar que la mayoría de las enzimas participantes en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) se expresan en altos niveles en astrocitos y que el análisis de espectrometría de masas de los intermediarios del ciclo TCA confirmaron que los astrocitos adultos recién aislados mantienen un ciclo TCA activo [112]. Estos estudios experimentales junto con nuestras observaciones indican que los astrocitos presentan metabolismo oxidativo y no dependen sólo de la glucólisis como su mayor fuente de ATP como se ha sugerido [108,113].

Con respecto a la activación de los flujos a través del ciclo pentosas fosfato, esta podría estar dada por la necesidad de detoxificar el sistema de los ROS generados por los procesos mitocondriales. Así mismo, el modelo muestra un flujo alto en la Glutamina Sintetasa con respecto a otras enzimas que metabolizan el glutamato, lo que sugiere que el glutamato es predominantemente convertido a glutamina por medio de una reacción dependiente de ATP y se observa que para solventar estos requerimientos energéticos generados en las simulaciones, se aumentó el flujo en la captación de glucosa. De esta manera se estimula la glicólisis aeróbica en el modelo con una consecuente producción de energía por interrelación con otros ciclos. Estas observaciones son confirmadas por Pellerin and Magistretti que descubrieron que el glutamato estimula la glucólisis en astrocitos [31].

La simulación de una condición patológica en los astrocitos se correlacionó positivamente con lo informado en la literatura [114,115]. Esto demuestra que el modelo *in silico* de astrocitos que aquí se presenta, es un buen predictor del comportamiento metabólico y simula los cambios en los flujos metabólicos en respuesta a la isquemia, por lo tanto, este modelo puede ser empleado para la evaluación de los posibles tratamientos, la determinación biomarcadores y la identificación de blancos terapéuticos activos en isquemia.

Se simuló el comportamiento del astrocito en un estado de activación glutamatérgica mediante el empleo de restricciones y la aplicación de tareas metabólicas acordes al sistema estudiado (la maximización simultánea del ciclo de glutamato/glutamina y producción de ATP), en ese sentido, se han obtenido valores de flujo que concuerdan con valores de flujo encontrados en la literatura. El poder predictivo de la reconstrucción, especialmente a nivel de los flujos obtenidos a través del metabolismo central del carbono y glutamato-glutamina son promisorios; debido a que estas rutas metabólicas están alteradas en la mayoría de enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, este modelo se puede utilizar en el análisis de diversas enfermedades neurológicas como Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrofia, esclerosis múltiple, esquizofrenia, entre otros.

De la misma manera, la generación del modelo metabólico computacional de astrocito permitirá a la comunidad científica dinamizar la evaluación de la pérdida de función de una o varias proteínas sobre una o varias rutas metabólicas presentes en el metabolismo de las células astrocíticas, permitiendo la identificación de rutas metabólicas asociadas a diferentes fenotipos

(enfermedades, lesiones, etc.), blancos terapéuticos, dilucidación del rol de proteínas claves en la respuesta a un insulto (metabólico, privación, etc.).

7. CONCLUSIONES

Comparado con los modelos estequiométricos cerebrales previos el modelo metabólico generado en este trabajo es la más grande reconstrucción que hasta la fecha ha sido reportada. De esta forma, se presenta la metodología para la construcción del modelo metabólico muticompartimento específico de astrocito, generado a partir de la integración datos transcriptómicos con la posterior curación manual.

El modelo presenta flujos en concordancia con lo reportado a nivel experimental lo que lo hace apto para dinamizar las diversas investigaciones referentes a los cambios metabólicos que ocurren en los astrocitos en respuesta a diversos insultos metabólicos.[114]

Las técnicas de análisis de flujos en modelos estequiométricos han sido aplicadas exitosamente para el análisis metabólico de diferentes sistemas humanos [116,78, 58]; en el caso del modelo metabólico del astrocito estas técnicas también fueron llevadas a cabo con éxito. Así mismo, el Random sampling del espacio de flujo puede servir para entender los cambios y las propiedades de la red en estados basales y patológicos de diversas células.

8. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES

El uso de la modelización estequiométrica para el análisis de diversas enfermedades metabólicas ya ha sido utilizado con éxito a nivel computacional y experimental [117,14]; por lo tanto, el modelo presentado en este trabajo se puede utilizar en el análisis de diversas enfermedades neurológicas metabólicas. De esta forma se espera que este enfoque computacional permita generar hipótesis de investigación que permitan la dinamización de los estudios experimentales en el campo de las neurociencias, permitiendo comprender el rol central y la participación del astrocito en los estados fisiológicos y patológicos del sistema nervioso central. Así mismo se espera que este modelo contribuya al descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos, a la identificación de biomarcadores y evaluación de posibles tratamientos en diversas patologías neurodegenerativas. Para este fin el modelo quedara abierto a la comunidad y será publicado en Biomodels [118], una base de datos especializada en la publicación de modelos matemáticos de interés biológico.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol*. Nature Publishing Group; 2006;2: 679–89. doi:10.1038/ncpneuro0355
2. Nedergaard M, Ransom B, Goldman S a. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*. 2003;26: 523–30. doi:10.1016/j.tins.2003.08.008
3. Sidoryk-Wegrzynowicz M, Aschner M. Role of astrocytes in manganese mediated neurotoxicity. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2013;14: 23. doi:10.1186/2050-6511-14-23
4. Magistretti PJ, Allaman I. A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. *Neuron*. 2015;86: 883–901. doi:10.1016/j.neuron.2015.03.035
5. Acaz-Fonseca E, Sanchez-Gonzalez R, Azcoitia I, Arevalo MA, Garcia-Segura LM. Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17 β -estradiol and selective estrogen receptor modulators. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;389: 48–57. doi:10.1016/j.mce.2014.01.009
6. Asgari M, de Zélicourt D, Kurtcuoglu V. How astrocyte networks may contribute to cerebral metabolite clearance. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2015;5: 15024. doi:10.1038/srep15024
7. Mamczur P, Borsuk B, Paszko J, Sas Z, Mozrzymas J, Wiśniewski JR, et al. Astrocyte-neuron crosstalk regulates the expression and subcellular localization of carbohydrate metabolism enzymes. *Glia*. 2015;63: 328–40. doi:10.1002/glia.22753
8. Verkhratsky A, Nedergaard M, Hertz L. Why are Astrocytes Important? *Neurochem Res*. 2014; doi:10.1007/s11064-014-1403-2
9. Castrillo JI, Oliver SG. Alzheimer's as a Systems-Level Disease Involving the Interplay of Multiple Cellular Networks. *Methods Mol Biol*. 2016;1303: 3–48. doi:10.1007/978-1-4939-2627-5_1
10. Thomas SC, Alhasawi A, Appanna VP, Auger C, Appanna VD. Brain metabolism and Alzheimer's disease: the prospect of a metabolite-based therapy. *J Nutr Health Aging*. Springer-Verlag France; 2015;19: 58–63. doi:10.1007/s12603-014-0511-7
11. Karlstädt A, Fliegner D, Kararigas G, Ruderisch HS, Regitz-Zagrosek V, Holzütter H-G. CardioNet: a human metabolic network suited for the study of cardiomyocyte metabolism. *BMC Syst Biol*. 2012;6: 114. doi:10.1186/1752-0509-6-114
12. Vo TD, Greenberg HJ, Palsson BO. Reconstruction and functional characterization of the human mitochondrial metabolic network based on proteomic and biochemical data. *J Biol Chem*. 2004;279: 39532–40.

doi:10.1074/jbc.M403782200

13. Lange SC, Bak LK, Waagepetersen HS, Schousboe A, Norenberg MD. Primary cultures of astrocytes: their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochem Res.* 2012;37: 2569–88. doi:10.1007/s11064-012-0868-0
14. Thiele I, Price ND, Vo TD, Palsson BØ. Candidate metabolic network states in human mitochondria. Impact of diabetes, ischemia, and diet. *J Biol Chem.* 2005;280: 11683–95. doi:10.1074/jbc.M409072200
15. Schellenberger J, Que R, Fleming RMT, Thiele I, Orth JD, Feist AM, et al. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat Protoc.* Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2011;6: 1290–307. doi:10.1038/nprot.2011.308
16. Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 2011;14: 724–38. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.016
17. Bouzier-Sore A-K, Pellerin L. Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Front Cell Neurosci.* *Frontiers*; 2013;7: 179. doi:10.3389/fncel.2013.00179
18. Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci.* 2004;27: 735–43. doi:10.1016/j.tins.2004.10.008
19. Verkhratsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh C-Y, Rodriguez JJ. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.* 2010;7: 399–412. doi:10.1016/j.nurt.2010.05.017
20. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew M V. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol.* Elsevier B.V.; 2015; doi:10.1016/j.expneurol.2015.03.020
21. Tang J, Liu T-B, Ma J, Luo J-M, Yang X-Q. Effect of calcium channel noise in astrocytes on neuronal transmission. *Commun Nonlinear Sci Numer Simul.* Elsevier; 2016;32: 262–272. doi:10.1016/j.cnsns.2015.08.019
22. Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurologia.* Elsevier; 2015;30: 119–29. doi:10.1016/j.nrl.2012.12.007
23. Bramanti V, Grasso S, Tibullo D, Giallongo C, Pappa R, Brundo MV, et al. Neuroactive molecules and growth factors modulate cytoskeletal protein expression during astroglial cell proliferation and differentiation in culture. *J Neurosci Res.* John Wiley and Sons Inc.; 2016;94: 90–8. doi:10.1002/jnr.23678
24. Cassarino DS, Bennett JP. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in

- neurodegeneration. *Brain Res Rev.* 1999;29: 1–25. doi:10.1016/S0165-0173(98)00046-0
25. Finsterwald C, Magistretti P, Lengacher S. Astrocytes: New Targets for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Curr Pharm Des.* 2015;21: 3570–3581. doi:10.2174/1381612821666150710144502
 26. Alvarez JI, Katayama T, Prat A. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia.* 2013;61: 1939–58. doi:10.1002/glia.22575
 27. Magistretti PJ, Pellerin L. Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News Physiol Sci.* 1999;14: 177–182. Available: <http://physiologyonline.physiology.org/content/14/5/177.short>
 28. Cheslow L, Alvarez JI. Glial-endothelial crosstalk regulates blood-brain barrier function. *Curr Opin Pharmacol.* Elsevier Ltd; 2015;26: 39–46. doi:10.1016/j.coph.2015.09.010
 29. Falkowska A, Gutowska I, Goschorska M, Nowacki P, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism. *Int J Mol Sci.* MDPI AG; 2015;16: 25959–25981. doi:10.3390/ijms161125939
 30. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001;65: 1–105. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369436>
 31. Hannuniemi R, Oja SS. Uptake of leucine, lysine, aspartic acid, and glycine into isolated neurons and astrocytes. *Neurochem Res.* 1981;6: 873–84. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6796899>
 32. Shanker G, Allen JW, Mutkus LA, Aschner M. The uptake of cysteine in cultured primary astrocytes and neurons. *Brain Res.* 2001;902: 156–163. doi:10.1016/S0006-8993(01)02342-3
 33. Violence and Injury Prevention and Disability (VIP) [Internet]. 2014 p. [http://www.who.int/violence_injury_prevention/roa].
 34. Kuroiwa T, Tabata H, Xi G, Hua Y, Schallert T, Keep RF. Analysis of Small Ischemic Lesions in the Examinees of a Brain Dock and Neurological Examination of Animals Subjected to Cortical or Basal Ganglia Photothrombotic Infarction. *Acta Neurochir Suppl.* Springer-Verlag Wien; 2016;121: 93–7. doi:10.1007/978-3-319-18497-5_16
 35. Schreihofner D a., Ma Y. Estrogen receptors and ischemic neuroprotection: Who, what, where, and when? *Brain Res.* Elsevier; 2013;1514: 107–122. doi:10.1016/j.brainres.2013.02.051
 36. Kimberly WT, Battay TWK, Wu O, Singhal AB, Campbell BC V, Davis SM, et al. Novel Imaging Markers of Ischemic Cerebral Edema and Its Association with Neurological Outcome. *Acta Neurochir Suppl.* Springer-Verlag Wien; 2016;121: 223–6. doi:10.1007/978-3-319-18497-5_40

37. Hadanny A, Efrati S. Oxygen--a limiting factor for brain recovery. *Crit Care. BioMed Central Ltd.*; 2015;19: 307. doi:10.1186/s13054-015-1034-2
38. Lopez-Rodriguez AB, Ávila-Rodriguez M, Vega-Vela NE, Capani F, Gonzalez J, García-Segura LM, et al. Neuroprotection by Exogenous Estrogenic Compounds Following Traumatic Brain Injury. 2015; 73–90. doi:10.1016/B978-0-12-801479-0.00006-1
39. Xiang J, Tang Y, Li C, Su EJ, Lawrence DA, Keep RF. Mechanisms Underlying Astrocyte Endfeet Swelling in Stroke. *Acta Neurochir Suppl. Springer-Verlag Wien*; 2016;121: 19–22. doi:10.1007/978-3-319-18497-5_4
40. Molofsky A V, Krencik R, Krenick R, Ullian EM, Ullian E, Tsai H, et al. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 2012;26: 891–907. doi:10.1101/gad.188326.112
41. Barreto GE, Gonzalez J, Torres Y, Morales L. Astrocytic-neuronal crosstalk: Implications for neuroprotection from brain injury. *Neurosci Res. Elsevier Ireland Ltd and Japan Neuroscience Society*; 2011;71: 107–113. doi:10.1016/j.neures.2011.06.004
42. Palsson B. Metabolic systems biology. *FEBS Lett.* 2009;583: 3900–4. doi:10.1016/j.febslet.2009.09.031
43. Borodina I, Nielsen J. From genomes to in silico cells via metabolic networks. *Curr Opin Biotechnol.* 2005;16: 350–5. doi:10.1016/j.copbio.2005.04.008
44. Duarte NC, Becker S a, Jamshidi N, Thiele I, Mo ML, Vo TD, et al. Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 1777–82. doi:10.1073/pnas.0610772104
45. Haraldsdóttir HS, Thiele I, Fleming RMT. Quantitative assignment of reaction directionality in a multicompartmental human metabolic reconstruction. *Biophys J.* 2012;102: 1703–11. doi:10.1016/j.bpj.2012.02.032
46. Thiele I, Swainston N, Fleming RMT, Hoppe A, Sahoo S, Aurich MK, et al. A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nat Biotechnol.* 2013;31: 419–25. doi:10.1038/nbt.2488
47. Agren R, Bordel S, Mardinoglu A, Pornputtapong N, Nookaew I, Nielsen J. Reconstruction of genome-scale active metabolic networks for 69 human cell types and 16 cancer types using INIT. *PLoS Comput Biol. Public Library of Science*; 2012;8: e1002518. doi:10.1371/journal.pcbi.1002518
48. Jerby L, Shlomi T, Ruppin E. Computational reconstruction of tissue-specific metabolic models: application to human liver metabolism. *Mol Syst Biol.* 2010;6: 401. doi:10.1038/msb.2010.56
49. Sertbaş M, Ulgen K, Cakır T. Systematic analysis of transcription-level effects of neurodegenerative diseases on human brain metabolism by a newly reconstructed brain-specific metabolic network. *FEBS Open Bio.* 2014;4: 542–53. doi:10.1016/j.fob.2014.05.006

50. Campillos M, Kuhn M, Gavin A-C, Jensen LJ, Bork P. Drug target identification using side-effect similarity. *Science*. 2008;321: 263–266. doi:10.1126/science.1158140
51. Bordbar A, Palsson BO. Using the reconstructed genome-scale human metabolic network to study physiology and pathology. *J Intern Med*. 2012;271: 131–41. doi:10.1111/j.1365-2796.2011.02494.x
52. Gianchandani EP, Chavali AK, Papin JA. The application of flux balance analysis in systems biology. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2: 372–82. doi:10.1002/wsbm.60
53. Thiele I, Palsson BØ. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nat Protoc*. 2010;5: 93–121. doi:10.1038/nprot.2009.203
54. Hyduke DR, Lewis NE, Palsson BØ. Analysis of omics data with genome-scale models of metabolism. *Mol Biosyst*. 2013;9: 167–74. doi:10.1039/c2mb25453k
55. Feist AM, Herrgård MJ, Thiele I, Reed JL, Palsson BØ. Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7: 129–43. doi:10.1038/nrmicro1949
56. Lerman J a., Hyduke DR, Latif H, Portnoy V a., Lewis NE, Orth JD, et al. In silico method for modelling metabolism and gene product expression at genome scale. *Nat Commun*. Nature Publishing Group; 2012;3: 929. doi:10.1038/ncomms1928
57. Wu W, Jamshidi N, Eraly SA, Liu HC, Bush KT, Palsson BO, et al. Multispecific drug transporter Slc22a8 (Oat3) regulates multiple metabolic and signaling pathways. *Drug Metab Dispos*. 2013;41: 1825–34. doi:10.1124/dmd.113.052647
58. del Sol A, Balling R, Hood L, Galas D. Diseases as network perturbations. *Curr Opin Biotechnol*. 2010;21: 566–71. doi:10.1016/j.copbio.2010.07.010
59. Manuscript A. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. 2011;5: 93–121. doi:10.1038/nprot.2009.203.A
60. Papin JA, Hunter T, Palsson BO, Subramaniam S. Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2005;6: 99–111. doi:10.1038/nrm1570
61. Schellenberger J, Park JO, Conrad TM, Palsson BØ. BiGG : a Biochemical Genetic and Genomic knowledgebase of large scale metabolic reconstructions Database. *bioinformatics*. 2010;11: 213.
62. Rozen S, Cudkowicz ME, Bogdanov M, Matson WR, Kristal BS, Beecher C, et al. Metabolomic analysis and signatures in motor neuron disease. *Metabolomics*. 2005;1: 101–108. doi:10.1007/s11306-005-4810-1
63. Orth JD, Thiele I, Palsson BØ. What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol*.

- Nature Publishing Group; 2010;28: 245–8. doi:10.1038/nbt.1614
64. Nagrath D, Avila-Elchiver M, Berthiaume F, Tilles AW, Messac A, Yarmush ML. Integrated energy and flux balance based multiobjective framework for large-scale metabolic networks. *Ann Biomed Eng.* 2007;35: 863–885. doi:10.1007/s10439-007-9283-0
 65. García Sánchez CE, Torres Sáez RG. Comparison and analysis of objective functions in flux balance analysis. *Biotechnol Prog.* John Wiley and Sons Inc.; 2014;30: 985–91. doi:10.1002/btpr.1949
 66. Clarke BL. Stoichiometric network analysis. *Cell Biophys.* Humana Press; 1988;12: 237–253. doi:10.1007/BF02918360
 67. Lewis NE, Schramm G, Bordbar A, Schellenberger J, Andersen MP, Cheng JK, et al. Large-scale in silico modeling of metabolic interactions between cell types in the human brain. *Nat Biotechnol.* 2010;28: 1279–85. doi:10.1038/nbt.1711
 68. Cakir T, Alsan S, Saybaşili H, Akin A, Ulgen KO. Reconstruction and flux analysis of coupling between metabolic pathways of astrocytes and neurons: application to cerebral hypoxia. *Theor Biol Med Model.* 2007;4: 48. doi:10.1186/1742-4682-4-48
 69. Sertbaş M, Ulgen K, Cakir T. Systematic analysis of transcription-level effects of neurodegenerative diseases on human brain metabolism by a newly reconstructed brain-specific metabolic network. *FEBS Open Bio.* Elsevier; 2014;4: 542–53. doi:10.1016/j.fob.2014.05.006
 70. Calvetti D, Somersalo E. Quantitative in silico analysis of neurotransmitter pathways under steady state conditions. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4: 1–13. doi:10.3389/fendo.2013.00137
 71. Occhipinti R, Somersalo E, Calvetti D. Energetics of inhibition: insights with a computational model of the human GABAergic neuron-astrocyte cellular complex. *J Cereb Blood Flow Metab.* International Society for Cerebral Blood Flow & Metabolism, Inc.; 2010;30: 1834–46. doi:10.1038/jcbfm.2010.107
 72. Calvetti D, Somersalo E. Ménage à trois: the role of neurotransmitters in the energy metabolism of astrocytes, glutamatergic, and GABAergic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32: 1472–1483. doi:10.1038/jcbfm.2012.31
 73. Chatziioannou A, Palaiologos G, Kollis FN. Metabolic flux analysis as a tool for the elucidation of the metabolism of neurotransmitter glutamate. *Metab Eng.* 2003;5: 201–210. doi:10.1016/S1096-7176(03)00029-6
 74. Nathan E, Lewis, Gunnar Schramm, Aarash Bordbar, Jan Schellenberger, Michael Paul Andersen, Jeffrey K. Cheng, Nilam Patel, Alex Yee, Randall A. Lewis, Roland Eils, Rainer König and BØP. Formulating multicellular models of metabolism in tissues: application to energy metabolism in the human brain. *Nat Biotechnol.* 2010;28: 1279–85. doi:10.1038/nbt.1711. Formulating
 75. Thiele I, Palsson BØ. A protocol for generating a high-quality genome-scale

- metabolic reconstruction. *Nat Protoc.* Nature Publishing Group; 2010;5: 93–121. doi:10.1038/nprot.2009.203
76. Beurton-aimar M, Nguyen TV, Colombie S. *Plant Metabolic Flux Analysis-Methods and Protocols.* 2014;1090: 1–366. doi:10.1007/978-1-62703-688-7
 77. Baart GJE, Martens DE. Genome-scale metabolic models: reconstruction and analysis. *Methods Mol Biol.* 2012;799: 107–26. doi:10.1007/978-1-61779-346-2_7
 78. Malik N, Wang X, Shah S, Efthymiou AG, Yan B, Heman-Ackah S, et al. Comparison of the gene expression profiles of human fetal cortical astrocytes with pluripotent stem cell derived neural stem cells identifies human astrocyte markers and signaling pathways and transcription factors active in human astrocytes. *PLoS One.* Public Library of Science; 2014;9: e96139. doi:10.1371/journal.pone.0096139
 79. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res.* 2013;41: D991–5. doi:10.1093/nar/gks1193
 80. Li C, Donizelli M, Rodriguez N, Dharuri H, Endler L, Chelliah V, et al. BioModels Database: An enhanced, curated and annotated resource for published quantitative kinetic models. *BMC Syst Biol.* 2010;4: 92. doi:10.1186/1752-0509-4-92
 81. Binder JX, Pletscher-Frankild S, Tsafou K, Stolte C, O'Donoghue SI, Schneider R, et al. COMPARTMENTS: unification and visualization of protein subcellular localization evidence. *Database (Oxford).* 2014;2014: bau012. doi:10.1093/database/bau012
 82. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 2014;42: D199–205. doi:10.1093/nar/gkt1076
 83. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science (80-).* 2015;347: 1260419–1260419. doi:10.1126/science.1260419
 84. Shen J, Petersen KF, Behar KL, Brown P, Nixon TW, Mason GF, et al. Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo ¹³C NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96: 8235–40. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22218&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 85. Gruetter R. In vivo ¹³C NMR studies of compartmentalized cerebral carbohydrate metabolism. *Neurochem Int.* 41: 143–54. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12020614>
 86. Aureli T, Di Cocco ME, Calvani M, Conti F. The entry of [1-¹³C]glucose into biochemical pathways reveals a complex compartmentation and metabolite

- trafficking between glia and neurons: a study by ^{13}C -NMR spectroscopy. *Brain Res.* 1997;765: 218–27. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9313894>
87. Amaral AI, Teixeira AP, Håkonsen BI, Sonnewald U, Alves PM. A comprehensive metabolic profile of cultured astrocytes using isotopic transient metabolic flux analysis and C-labeled glucose. *Front Neuroenergetics.* 2011;3: 5. doi:10.3389/fnene.2011.00005
 88. Murín R, Mohammadi G, Leibfritz D, Hamprecht B. Glial metabolism of isoleucine. *Neurochem Res.* 2009;34: 194–204. doi:10.1007/s11064-008-9840-4
 89. Lanz B, Gruetter R, Duarte JMN. Metabolic Flux and Compartmentation Analysis in the Brain In vivo. *Front Endocrinol (Lausanne).* *Frontiers;* 2013;4: 156. doi:10.3389/fendo.2013.00156
 90. Westergaard N, Varming T, Peng L, Sonnewald U, Hertz L, Schousboe A. Uptake, release, and metabolism of alanine in neurons and astrocytes in primary cultures. *J Neurosci Res.* 1993;35: 540–5. doi:10.1002/jnr.490350510
 91. Zwingmann C, Leibfritz D. Regulation of glial metabolism studied by ^{13}C -NMR. *NMR Biomed.* 16: 370–99. doi:10.1002/nbm.850
 92. Lebon V, Petersen KF, Cline GW, Shen J, Mason GF, Dufour S, et al. Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy: elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism. *J Neurosci.* 2002;22: 1523–31. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2995528&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 93. Cruz F, Cerdán S. Quantitative ^{13}C NMR studies of metabolic compartmentation in the adult mammalian brain. *NMR Biomed.* 1999;12: 451–62. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10654292>
 94. Zwingmann C, Richter-Landsberg C, Brand A, Leibfritz D. NMR spectroscopic study on the metabolic fate of [3- ^{13}C]alanine in astrocytes, neurons, and cocultures: implications for glia-neuron interactions in neurotransmitter metabolism. *Glia.* 2000;32: 286–303. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102969>
 95. Verleysdonk S, Martin H, Willker W, Leibfritz D, Hamprecht B. Rapid uptake and degradation of glycine by astroglial cells in culture: synthesis and release of serine and lactate. *Glia.* 1999;27: 239–48. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10457370>
 96. Chateil J, Biran M, Thiaudière E, Canioni P, Merle M. Metabolism of [1- ^{13}C]glucose and [2- ^{13}C]acetate in the hypoxic rat brain.. *Neurochem Int.* 2001;38: 399–407. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222920>

97. Wiback SJ, Famili I, Greenberg HJ, Palsson BØ. Monte Carlo sampling can be used to determine the size and shape of the steady-state flux space. *J Theor Biol.* 2004;228: 437–47. doi:10.1016/j.jtbi.2004.02.006
98. Ivanov AI, Malkov AE, Waseem T, Mukhtarov M, Buldakova S, Gubkina O, et al. Glycolysis and oxidative phosphorylation in neurons and astrocytes during network activity in hippocampal slices. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34: 397–407. doi:10.1038/jcbfm.2013.222
99. Brekke EMF, Morken TS, Widerøe M, Håberg AK, Brubakk A-M, Sonnewald U. The pentose phosphate pathway and pyruvate carboxylation after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab. International Society for Cerebral Blood Flow & Metabolism, Inc.;* 2014;34: 724–34. doi:10.1038/jcbfm.2014.8
100. Bolaños JP, Delgado-Esteban M, Herrero-Mendez A, Fernandez-Fernandez S, Almeida A. Regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway by nitric oxide: impact on neuronal survival. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1777: 789–93. doi:10.1016/j.bbabi.2008.04.011
101. Malarkey EB, Parpura V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int.* 2008;52: 142–54. doi:10.1016/j.neuint.2007.06.005
102. Arauz A RA. Enfermedad Vascular Cerebral. *Rev la Fac Med la UNAM.* 2012;55: 11–21.
103. Castelló-Ruiz M, Torregrosa G, Burguete MC, Miranda FJ, Centeno JM, López-Morales M a., et al. The selective estrogen receptor modulator, bazedoxifene, reduces ischemic brain damage in male rat. *Neurosci Lett. Elsevier Ireland Ltd;* 2014;575: 53–57. doi:10.1016/j.neulet.2014.05.024
104. Chen Y, Swanson R a. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23: 137–149. doi:10.1097/00004647-200302000-00001
105. Lying-Tunell U, Lindblad BS, Malmlund HO, Persson B. Cerebral blood flow and metabolic rate of oxygen, glucose, lactate, pyruvate, ketone bodies and amino acids. *Acta Neurol Scand.* 2009;63: 337–350. doi:10.1111/j.1600-0404.1981.tb00788.x
106. Rossi DJ, Brady JD, Mohr C. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci.* 2007;10: 1377–1386. doi:10.1038/nn2004
107. Wong-Riley MTT. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci. Elsevier;* 1989;12: 94–101. doi:10.1016/0166-2236(89)90165-3
108. Lovatt D, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A, He W, Lin JH-C, et al. The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J Neurosci.* 2007;27: 12255–66. doi:10.1523/JNEUROSCI.3404-07.2007
109. Panov A, Orynbayeva Z, Vavilin V, Lyakhovich V. Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *Biomed Res Int.* 2014;2014.

doi:10.1155/2014/472459

110. Ivanov AI, Malkov AE, Waseem T, Mukhtarov M, Buldakova S, Gubkina O, et al. Glycolysis and oxidative phosphorylation in neurons and astrocytes during network activity in hippocampal slices. *J Cereb Blood Flow Metab. International Society for Cerebral Blood Flow & Metabolism, Inc.*; 2014;34: 397–407. doi:10.1038/jcbfm.2013.222
111. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001;65: 1–105. doi:10.1016/S0301-0082(00)00067-8
112. Jackson JG, O'Donnell JC, Takano H, Coulter DA, Robinson MB. Neuronal activity and glutamate uptake decrease mitochondrial mobility in astrocytes and position mitochondria near glutamate transporters. *J Neurosci.* 2014;34: 1613–24. doi:10.1523/JNEUROSCI.3510-13.2014
113. Lewis NE, Schramm G, Bordbar A, Schellenberger J, Andersen MP, Cheng JK, et al. Large-scale in silico modeling of metabolic interactions between cell types in the human brain. *Nat Biotechnol.* Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2010;28: 1279–85. doi:10.1038/nbt.1711
114. Agren R, Liu L, Shoaie S, Vongsangnak W, Nookaew I, Nielsen J. The RAVEN toolbox and its use for generating a genome-scale metabolic model for *Penicillium chrysogenum*. *PLoS Comput Biol.* Public Library of Science; 2013;9: e1002980. doi:10.1371/journal.pcbi.1002980
115. Price ND, Thiele I, Palsson BØ. Candidate states of *Helicobacter pylori*'s genome-scale metabolic network upon application of “loop law” thermodynamic constraints. *Biophys J.* Elsevier; 2006;90: 3919–28. doi:10.1529/biophysj.105.072645
116. Juty N, Ali R, Glont M, Keating S, Rodriguez N, Swat MJ, et al. BioModels: Content, Features, Functionality, and Use. *CPT pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2015;4: e3. doi:10.1002/psp4.3

10. ANEXO 1

Sumario de la composición de la red metabólica del astrocito: las abreviaturas usadas corresponden a: C, citosol; G, Aparato del golgi; L, lisosoma; M, mitocondria; N, Núcleo;

P, peroxisoma; R Retículo Endoplásmico; S, extracelular.

Sumario de la composición de la red metabólica del astrocito											
Nº	Ruta metabólica	Nº reacción -Compartimento									Nº reacciones
		c	g	l	m	n	p	r	s	x	
1	Acyl-CoA hydrolysis	70		1	5		1				77
2	Acylglycerides	17			1						18
3	Alanine, aspartate and glutamate	13			16						29
4	Amino sugar and nucleotide sugar	24		1		1		2			28
5	Aminoacyl-tRNA	21									21
6	Arachidonic acid	48			2		8	10	2		70
7	Arginine and proline	24			22		6				52
8	Artificial reactions	31			3	1		1		4	40
9	Ascorbate and aldarate	11						2			13
10	Beta oxidation	1			191		134				326
11	beta-Alanine	3			3						6
12	Bile acid biosynthesis	44			35		17	5	2		103
13	Butanoate	5			1		1				7
14	Carnitine shuttle	65			110		8	122			305
15	Cholesterol	52		60	2		2	118			234
16	Chondroitin / heparan		41	74				1			116
17	Cysteine and methionine	25			5	1					31
18	Eicosanoid	4						8			12
19	Estrogen	34		2	6		6	18			66
20	Ether lipid	10					3				13
21	Fatty acid	143			1		1	55			200
22	Folate	13		9	8						30
23	Fructose and mannose	15									15
24	Galactose	11	1	1							13
25	Glutathione	9			2						11
26	Glycerolipid	123	1		8		2	25	1		160

27	Glycine, serine and threonine	17			16		1				34
28	Glycolysis / Gluconeogenesis	28			5		2				35
29	Glycosphingolipid	42		14				1			57
30	Histidine	4			1						5
31	Inositol phosphate	40	3			7		5			55
32	Isolated	18									18
33	Keratan sulfate biosynthesis		22	74							96
34	Leukotriene	29			22		50	13	2		116
35	Linoleate	9						7			16
36	Lipoic acid	5									5
37	Lysine	11			7	4	4	1			27
38	xenobioticsP450	82									82
39	Miscellaneous	4		1	2		1				8
40	N-O glycan	16	41	11				18			86
41	Nicotinate and nicotinamide	18			2	4	1				25
42	Nucleotide	44	3	7	15	35			3		107
43	Omega-3,6	11			15	4	28	5			63
44	Other amino acid	13				1	1				15
45	Oxidative phosphorylation	1			5		1	1			8
46	Pentose phosphate pathway	25						6			31
47	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan	77			1						78
48	Porphyrin	13			4						17
49	Propanoate	3			6		1				10
50	prostaglandin	24						5			29
51	Protein	9		9							18
52	Purine	72			7		3		1		83
53	Pyrimidine	39			13	3		1			56
54	Pyruvate	15			7						22
55	Retinol	17						11			28
56	Riboflavin	5									5
57	ROS detoxification	2			2	1	1		1		7
58	Serotonin	7									7
59	Sphingolipid	20	25	4				5	1		55
60	Starch and sucrose	19		2							21
61	Steroid				2			12			14

62	Sulfur	4			1						5
63	Terpenoid	5			1						6
64	Tricarboxylic acid cycle	4			24		3				31
65	Tryptophan	6			3						9
66	Tyrosine	14			2						16
67	Valine, leucine, and isoleucine	4			29						33
68	Vitamin D-E	13			21			6			40

ANEXO 2

Script desarrollado para determinar metabolitos "dead end"

```
#!/bin/bash

output="Resultados.data"
rm $output

###Las siguientes lineas generan, a partir de un archivo con reacciones,
###dos archivos (reactivos y productos) por Field Separator "="
awk -F= '{ if (/<=>/) {print $1, $2} else {print $2}}' $1 > productos.data
awk -F= '{ if (/<=>/) {print $1, $2} else {print $1}}' $1 > reactivos.data

###De la lista de cada archivo se eliminan '<, >, +, coeficientes estequiometricos y espacios
en blanco al final de la linea###
###Se genera un archivo con el numero de repeticiones de cada metabolito (conteo_.txt)
y se listan los metabolitos sin repeticiones en un archivo (.data)###
cat productos.data | sed 's/> //g' | sed 's/ </n/g' | sed 's/ + /n/g' | sed 's/^[0-9]* //g' >
productos1.data
#####
echo -e "Resultados de analisis de reacciones de archivo $1 \n
*****Productos final*****
**Conteo Productos" >> $output
#####

sort productos1.data | uniq -c >> $output
sort productos1.data | uniq > productosfinal.data

cat reactivos.data | sed 's/ </g' | sed 's/> /n/g' | sed 's/ + /n/g' | sed 's/^[0-9]* //g' | sed 's/
*$/g' > reactivos1.data

#####
echo -e "\n*****Reactivos final*****
**Conteo Reactivos" >> $output
#####

sort reactivos1.data | uniq -c >> $output
sort reactivos1.data | uniq > reactivosfinal.data

###Con cat se unen los dos archivos de productos y reactivos y se genera una lista de
metabolitos sin ninguna conexion###
echo -e "\n*****Metabolitos Desconectados*****" >> $output
cat productosfinal.data reactivosfinal.data > msc.txt
cat msc.txt | sort | uniq -u >> $output
```

Anexo 3

Script desarrollado para traer reacciones de transporte

```
#!/bin/bash

cat $1 | sed 's/;/\n/g' | sort | uniq > out1
rm out

while read line
do
grep -w "$line" genes_HMA.data
done < out1 >> genes.txt
```

ANEXO 4

Fragmento de la red metabólica de astrocito

RXN ID	NAME	EQUATION	EC-NUMBER	GENE ASSOCIATION	LOWER BOUND	UPPER BOUND	OBJECTIVE	COMPARTMENT	SUBSYSTEM	SBO TERM	HEPATON ET1 ID	REACTOME ID	KEGG ID	EHMN ID	BIGG DATABASE ID
HMR_3905	R_2105	NAD+[c] + ethanol[c] => H+[c] + NADH[c] + acetaldehyde[c]	EC:1.1.1.1;EC:1.1.1.7	ENSG00000147576;ENSG00000172955;ENSG00000180011;ENSG00000187758;ENSG00000196344;ENSG00000196616;ENSG00000197894;ENSG00000198099;ENSG00000248144				c	Glycolysis / Gluconeogenesis	SBO:0000176	r0187		R00754	R00754C	ALCD2if
HMR_3907	R_2106	NADP+[c] + ethanol[c] => H+[c] + NADPH[c] + acetaldehyde[c]	EC:1.1.1.2	ENSG00000117448				c	Glycolysis / Gluconeogenesis	SBO:0000176			R00746		ALCD2yf
HMR_4097	R_2203	ATP[c] + CoA[c] + acetate[c] => AMP[c] + PPi[c] + acetyl-CoA[c]	EC:6.2.1.1	ENSG00000131069				c	Glycolysis / Gluconeogenesis	SBO:0000176	r0066		R00235	R00235C	ACS
HMR_4099	R_2204	ATP[m] + CoA[m] + acetate[m] => AMP[m] + PPi[m] + acetyl-CoA[m]	EC:6.2.1.1	ENSG00000111058;ENSG00000154930				m	Glycolysis / Gluconeogenesis	SBO:0000176	r0067		R00235	R00235C	ACSm
HMR_4108	R_2208	CoA[c] + acetyl adenylate[c] => AMP[c] + acetyl-CoA[c]	EC:6.2.1.1	ENSG00000131069				c	Glycolysis / Gluconeogenesis	SBO:0000176	r0068		R00236	R00236C	
HMR_4133	R_2227	ATP[c] + acetate[c] => PPi[c] + acetyl adenylate[c]	EC:6.2.1.1	ENSG00000131069				c	Glycolysis / Gluconeogenesis	SBO:0000176	r0097		R00316	R00316C	
HMR_4137	R_2229	CoA[m] + NAD+[m] + pyruvate[m] => CO2[m] + H+[m] + NADH[m] + acetyl-CoA[m]	EC:1.2.4.1;EC:2.3.1.12;EC:1.8.1.4;EC:1.2.1.51	ENSG00000091140;ENSG00000110435;ENSG00000131828;ENSG00000150768;ENSG00000163114;ENSG00000168291				m	Glycolysis / Gluconeogenesis	SBO:0000176	r0056		R00209	R00209C	PDHm
HMR_4281	R_2298	H+[p] + NADH[p] + pyruvate[p] <=> L-lactate[p] + NAD+[p]	EC:1.1.1.27	ENSG00000111716;ENSG00000151116;ENSG00000166796;ENSG00000168800;ENSG00000171989				p	Glycolysis / Gluconeogenesis	SBO:0000176	r0173		R00703	R00703C	
HMR_4283	R_2299	H2O[c] + NADP+[c] + acetaldehyde[c] => H+[c] + NADPH[c] + acetate[c]	EC:1.2.1.5	ENSG0000006534;ENSG00000108602;ENSG00000132746;ENSG00000184254				c	Glycolysis / Gluconeogenesis	SBO:0000176	r0177		R00711	R00711C	
HMR_4301	R_2308	UTP[c] + fructose-6-phosphate[c] => UDP[c] + fructose-1,6-bisphosphate[c]	EC:2.7.1.11	ENSG00000067057;ENSG00000141959;ENSG00000152556;ENSG00000160226				c	Glycolysis / Gluconeogenesis	SBO:0000176	r0191		R00769		
HMR_4355	R_2339	DHAP[c] + erythrose-4-phosphate[c] => sedoheptulose-1,7-bisphosphate[c]	EC:4.1.2.13	ENSG00000109107;ENSG00000136872;ENSG00000149925				c	Glycolysis / Gluconeogenesis	SBO:0000176	r0407		R01829	R01829C	
HMR_4358	R_2341	ADP[c] + PEP[c] => ATP[c] + pyruvate[c]	EC:2.7.1.40	ENSG00000067225;ENSG00000121900;ENSG00000143627;ENSG00000143630				c	Glycolysis / Gluconeogenesis	SBO:0000176	r0054		R00200	R00200C	PYK

