



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**IMPLEMENTACIÓN DE ALGORITMOS COMPUTACIONALES Y
MATEMÁTICOS PARA MODELAR LA MOTILIDAD EN FLAGELADOS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
JESÚS ESPINAL ENRÍQUEZ

TUTOR:
DR. GUSTAVO MARTÍNEZ MEKLER

Instituto de Ciencias Físicas, UNAM

MÉXICO, D. F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Un agradecimiento especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por haberme otorgado una beca de estudios de doctorado.

También quisiera agradecer a los siguientes proyectos que me apoyaron económicamente durante el doctorado en cuestiones de viajes, viáticos, equipo de trabajo y asistencia a conferencias:

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)

- IN112514
- IN109111
- IN109210
- IN112407

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

- 49113
- 129471

Sin su apoyo, este grado no hubiera podido ser obtenido.

IMPLEMENTACIÓN DE ALGORITMOS
COMPUTACIONALES Y MATEMÁTICOS PARA
MODELAR LA MOTILIDAD EN FLAGELADOS.

Jesús Espinal

20 de enero de 2014

Índice general

Índice general	2
1 Introducción	8
1.1 Marco Teórico	9
1.2 Via de señalización activada por speract	13
2 El Modelo Discreto	16
2.1 Tipos de Modelos	17
2.2 La Red	18
2.3 Utilización de nodos con tres posibles estados	20
2.4 Construcción de la dinámica de una red lógica	22
2.4.1 Dinámica de la red	22
2.5 Resultados	25
2.5.1 Evolución de la red	25
2.5.2 Corroboraciones experimentales	25
2.5.3 Predicciones	27
3 Efecto <i>in silico</i> de fármacos multi-blanco	30
3.1 Motivación	31
3.2 Resultados	33
3.2.1 Las fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ son moduladas por la cinética de los canales CaKC, CaCC y HCN.	33
3.2.1.1 Observaciones de nodos individuales	33
3.2.1.2 Observaciones por parejas	34
3.2.1.3 Eliminando los tres canales sensibles a NFA	35
3.3 Relaciones causales del bloqueo de los canales sensibles a NFA	37
3.4 Resolviendo una controversia	39

4	Propiedades globales de la red	40
4.1	Régimen dinámico	41
4.1.1	Mapeo de Derrida	41
4.1.2	Criticalidad	42
4.2	Redundancia	43
5	Refinando el modelo: el canal CatSper	46
5.1	Motivación	47
5.1.1	Canal CatSper	49
5.1.2	Tabla de verdad de CatSper	50
5.2	Cambiando la regulacion del calcio intracelular	51
5.2.1	Primera aproximacion: todos los canales de calcio	51
5.2.2	Sin canales HVA y LVA	52
5.2.2.1	Reconstruyendo la tabla del canal CaKC	52
5.2.3	Bloqueos previos	53
5.2.4	Resultados de NFA	54
5.2.5	NFA activa a CatSper	56
5.3	El caso de iberiotoxina	57
5.4	Robustez	59
5.5	Redundancia en redes bioquímicas	63
5.5.1	Análisis de redundancia en la red de señalización activada por speract en el espermatozoide de erizo de mar	63
5.5.1.1	Curvas de $[Ca^{2+}]_i$	63
5.5.1.2	Atractores	64
5.5.1.3	Mapeo de Derrida	66
5.5.1.4	Correlaciones entre las curvas de calcio	67
5.6	Experimento y Modelo	72
6	Redes acopladas en el espacio	74
6.1	Misma vía de señalización, misma molécula activadora (speract), dos diferentes tipos de nado.	75
6.2	¿Cómo medir la sincronización?	77
6.3	¿Cuántas redes hay que acoplar?	79
6.3.1	Análisis de los transitorios dependiendo del acoplamiento	80
6.3.2	¿Por qué esa discontinuidad en los transitorios?	80
6.4	Flagelo isotopotencial	83
6.4.1	Cómo modelar el voltaje isotopotencial	84

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	4
7 Consideraciones finales	86
Bibliografía	96

Resumen

El objetivo único del espermatozoide es fecundar al óvulo. Para lograrlo, cuenta con un sistema de locomoción finamente regulado. En especies con fecundación externa, el proceso de búsqueda del óvulo por el espermatozoide se vuelve particularmente difícil, por la dispersión de los huevos en el medio. A lo largo de la evolución, diversas especies han desarrollado mecanismos para conseguir este objetivo, uno de ellos es la quimiotaxis, con la cual, el esperma nada siguiendo señales químicas que provienen del óvulo. En erizo de mar, este proceso ha sido ampliamente estudiado. Para seguir la señal proveniente del óvulo, el espermatozoide se vale de una vía de señalización bioquímica que inicia con la unión de la molécula derivada del huevo y su receptor presente en la membrana del flagelo. Una vez que ocurre la unión, se desencadena una serie de procesos intracelulares que culminan con oscilaciones en el calcio intracelular; estas oscilaciones están ligadas a cambios en la orientación del nado de los espermatozoides. Cambios bruscos en la concentración de calcio intracelular generan vueltas pronunciadas, seguidas de un nado más recto. De este modo, el esperma sigue la fuente del quimioatrayente. La vía de señalización que desencadena este proceso, pese a haber sido ampliamente estudiada, no ha sido caracterizada completamente, debido a limitaciones experimentales.

En este trabajo modelamos la vía de señalización del espermatozoide de los erizos de mar *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*, por medio de una red lógica, que construimos con base en experimentos previos. Los resultados que se obtienen reproducen varios de los experimentos observados, predicen nuevos componentes de la vía que no habían sido considerados previamente, abordan el efecto de fármacos multi-blanco *in silico*, sugieren la existencia de islotes de señalización distribuidos a lo largo del flagelo y muestran propiedades globales de la red necesarias para el mantenimiento de su estructura y su dinámica. Con los resultados aquí obtenidos, se intenta dar una explicación sobre la manera en que diversos organismos han desarrollado estructuras a lo largo de su evolución para conseguir su objetivo principal que es el mantenimiento de la especie. Con este tipo de trabajos, además de remarcar la importancia de ligar la experimentación con la teoría en biología, se pone de manifiesto las virtudes de un análisis integral de los mecanismos, factores y procesos que intervienen en las funciones de los seres vivos, enfoque que se ha venido designando como Biología de Sistemas.

Justificación

Dada la fuerte correlación de la forma, intensidad y frecuencia de las oscilaciones de calcio en el flagelo del espermatozoide con el redireccionamiento del mismo, es importante conocer tanto cualitativa, como cuantitativamente su origen e interdependencia. Tomando en cuenta que la estructura del axonema a lo largo de la evolución está altamente conservada, el comprender los mecanismos moleculares que gobiernan su movimiento resulta de gran importancia en general.

Es importante recalcar la importancia que adquieren los modelos teóricos en el contexto de los sistemas vivos, ya que la implementación de experimentos orientados a menudo se vuelve complicada. La tesis aquí presentada, constituye un esfuerzo por generar el conocimiento necesario para orientar experimentos y poder explicar situaciones que puedan estar en tela de juicio a la luz de únicamente resultados experimentales.

Finalmente, ante la falta de evidencia experimental, establecer un modelo basado en interacciones positivas y negativas, que no requiere conocer cuantitativamente al sistema, resulta de gran utilidad, puesto que permite hacer predicciones cualitativas, capaces de ser corroboradas posteriormente por medio de experimentos o de modelos más cuantitativos.

Objetivos

Objetivo General

Crear una red lógica para estudiar la vía de señalización activada por speract en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar, misma que da origen a la dinámica oscilatoria de calcio que reorienta el nado del mismo espermatozoide.

Objetivos Particulares

- Con base en este modelo, establecer las condiciones que llevan a situaciones observadas experimentalmente.
- Determinar los elementos que generan la dinámica del calcio en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar tras detectar moléculas de speract.
- Basados en análisis de propiedades globales de la red, determinar los elementos mínimos necesarios para obtener una dinámica de calcio de tipo oscilatoria.

Capítulo 1

Introducción

En este capítulo, se abordará la importancia de reproducción sexual, diferenciando la fecundación externa e interna, señalaremos el caso del erizo de mar Strongylocentrotus purpuratus y Lytechinus pictus como modelos de estudio, así como la vía de señalización de calcio activada por speract, con el fin de entender mejor los procesos bioquímicos que generan el cambio en el movimiento del espermatozoide en su búsqueda por el huevo. Se explicará cada uno de los procesos que intervienen en la generación de oscilaciones del calcio intracelular y de qué manera se relacionan con los cambios de simetría del flagelo. Finalmente, se explicará brevemente el modelo que se desarrolló en este trabajo, con la intención de situar al lector en contexto.

1.1 Marco Teórico

Uno de los eventos más fascinantes de la vida es la fecundación. La reproducción sexual, evolutivamente ha conferido a las especies que poseen este mecanismo, una mayor diversidad, variabilidad y adaptabilidad [1]. Dentro del reino animal, para que ésta se lleve a cabo, el espermatozoide debe encontrarse con el óvulo, y es a partir de este encuentro que ocurre una serie de eventos regulados que conllevan a la creación de un nuevo ser. Existen diversas formas de acercamiento del espermatozoide al óvulo para las cuales la motilidad del espermatozoide es un requisito indispensable [2].

En el reino animal, dependiendo del lugar donde se desarrolla el huevo fecundado, dicha fecundación puede ser interna o externa. En las especies con fecundación interna, el huevo se desarrolla dentro de la hembra (generalmente) hasta que se alcanza cierto nivel de madurez, en el que el cambio de ambiente ya no lo afecta. En cambio, en especies con fecundación externa, hembra y macho esparcen sus gametos y, es precisamente en el exterior donde los huevos fecundados se desarrollan. Este tipo de reproducción es comúnmente utilizada en organismos marinos. Ejemplos de esto lo encontramos en ascidios, equinodermos y otros órdenes [3].

Un excelente ejemplo de este tipo de reproducción, nos lo dan varias especies de erizo de mar, ya que, además de ser especies con fecundación externa, los espermatozoides de algunos de estos animales presentan una cualidad adicional: la forma en la que nadan está finamente regulada por sustancias que provienen de estructuras externas del ovocito. Este es el caso que en esta tesis nos ocupa, el de los espermatozoides de erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*, dos especies que responden a una pequeña molécula presente en la capa más externa del óvulo, la cual se difunde en el mar.

El espermatozoide del erizo de mar (Fig 1) se compone principalmente de una cabeza, donde se encuentra el núcleo de la célula, el acrosoma, que es el lugar donde se almacena toda la maquinaria para penetrar el huevo y proporcionar el material genético necesario para la reproducción; una pieza media, donde se encuentran las mitocondrias (organelos subcelulares que se encargan de la producción de energía en la célula) y el flagelo, el aparato de locomoción del esperma.

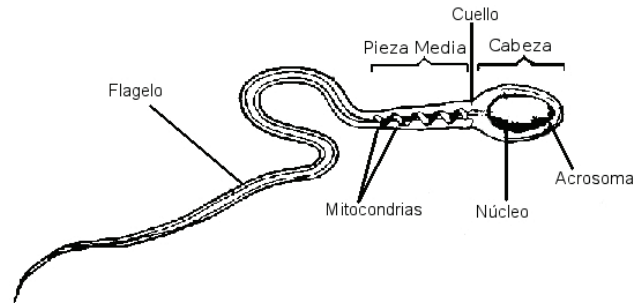


Figura 1. Representación esquemática del espermatozoide. Se pueden observar las estructuras subcelulares que lo componen.

El flagelo, con una longitud media de $40 \mu m$, tiene una estructura interna llamada axonema, constituida por 9 pares de microtúbulos que rodean un par central. Este arreglo es conocido como 9+2 por la distribución de sus microtúbulos (véase Fig 2). El desplazamiento relativo de éstos pares genera y orienta el movimiento del espermatozoide. En biología, para estudiar cualquier proceso resulta conveniente utilizar organismos con características particulares que simplifiquen su estudio. En el caso de la fecundación, uno de los organismos más utilizados es el erizo de mar, debido a la relativa sencillez de obtener y mantener sus espermatozoides. Cada erizo genera del orden de 10^{10} espermatozoides por eyaculación, esto es 1000 veces más que los humanos.

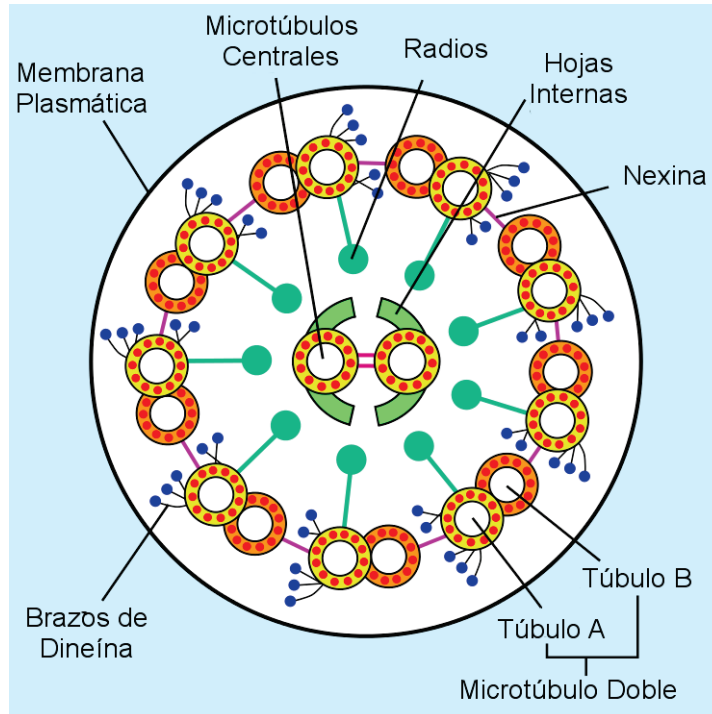


Figura 2. Representación de un corte transversal del flagelo de un espermatozoide donde se observa el arreglo de 9+2 microtúbulos. Esta estructura se conserva en casi todos los flagelos o cilios en células eucariontes.

Los espermatozoides de especies marinas han desarrollado a través de su evolución, patrones de búsqueda del ovocito; a su vez el óvulo ha desarrollado medios para ser rastreado por el espermatozoide. En el caso de los erizos de mar *S. purpuratus* y *L. pictus*, el óvulo posee en su capa más externa (gelatina), un decapeptido (molécula formada por 10 aminoácidos) llamado “*speract*” que al ser reconocido por receptores específicos, presentes en la membrana del flagelo del espermatozoide, desencadena una serie de procesos bioquímicos que producen una respuesta en los niveles de concentración del ión calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) con dos componentes: un aumento sostenido (respuesta tónica), cuya función se desconoce y, fluctuaciones superimpuestas a este aumento (respuesta fásica), véase Fig 3.

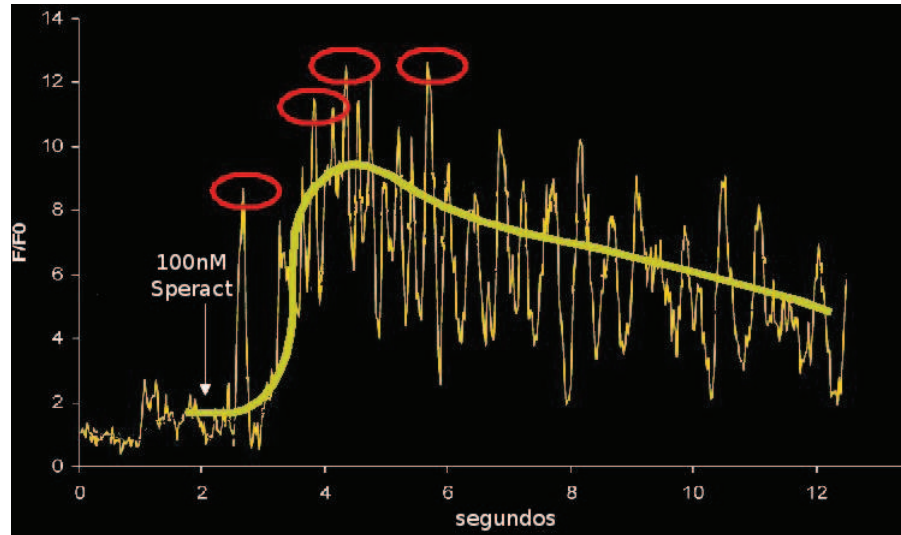


Figura 3. Variación de la concentración interna del ión calcio al adherirse speract (flecha) al flagelo del espermatozoide del erizo de mar. En esta gráfica se muestra un aumento sostenido (línea gruesa amarilla) y fluctuaciones superpuestas sobre el primero (elipses rojas). El eje Y indica la fluorescencia de calcio, el eje X es el tiempo. Modificada de [4].

La relevancia de estas oscilaciones en el calcio para el nado de los espermatozoides, radica en que están íntimamente ligadas con cambios en la simetría del flagelo, los cuales redireccionan el nado. La tasa de cambio en $[Ca^{2+}]_i$ produce giros pronunciados en la trayectoria del espermatozoide. En condiciones experimentales sin speract adicionado, el espermatozoide nada describiendo círculos. Una vez que el flagelo detecta una o más moléculas de speract, viene el nado con un giro muy pronunciado, seguido de un nado con una trayectoria más recta (fig 4).

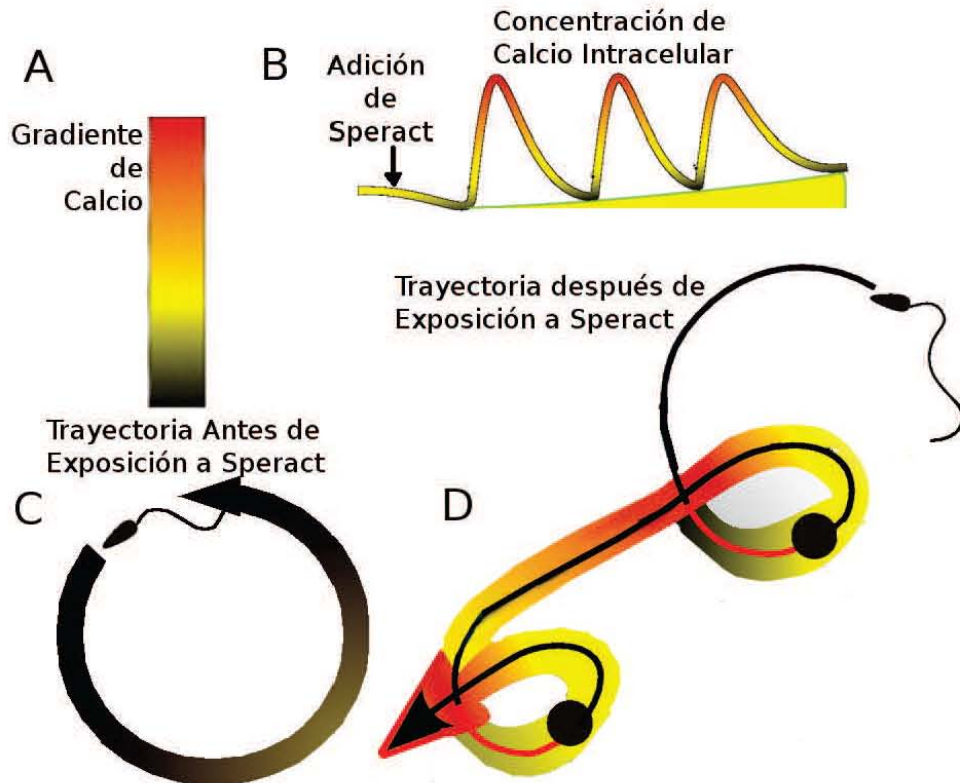


Figura 4. Trayectoria del espermatozoide de erizo de mar antes y después de ser expuesto a moléculas de speract. A) Código de colores de la concentración de calcio intracelular. B) Esquema representativo de los cambios en la concentración intracelular de calcio posterior a la adición de speract al medio en el que se mueve el espermatozoide. La parte de abajo (amarillo) representa el aumento sostenido de la concentración de calcio. Hasta el momento no se sabe a ciencia cierta qué es lo que produce este aumento. C) Trayectoria basal del espermatozoide de erizo de mar. La trayectoria es prácticamente circular al verse desde al microscopio. D) Trayectoria típica del espermatozoide después de ser expuesto a la molécula speract. (Modificado de [5]).

1.2 Vía de señalización activada por speract

El conocimiento basado en experimento que se tiene hasta el momento de la vía de señalización de la concentración del ion calcio intracelular activada por speract se ilustra en la Fig. 5 [6]. Al unirse el speract con su receptor en la membrana del flagelo, dicho receptor activa la enzima Guanilato Ciclasa (GC) [7, 8, 9, 10] que produce GMP cíclico (cGMP), que a su vez se une a un canal

de potasio dependiente de cGMP (KCNG) [11, 12, 13]. La unión de cGMP al canal provoca su apertura y la consecuente salida de potasio (el potasio es el catión intracelular más abundante, existe una mayor concentración en el interior de la célula que en su exterior, por lo tanto el flujo de iones es hacia fuera); la salida de potasio hiperpolariza la membrana, (el voltaje (v) se vuelve más negativo en el interior) [11, 4, 6, 5, 14]. La hiperpolarización activa varios procesos: a) un intercambiador sodio-calcio (NCE) que disminuye la concentración de calcio intracelular, b) el intercambiador sodio-protones (NHE) que aumenta el pHi intracelular (pHi); c) la remoción de la inactivación de los canales de calcio voltaje-dependientes de alto y bajo umbral (HVA y LVA), d) la activación de un canal catiónico activado por voltaje (HCN) y dependiente AMP cíclico (cAMP). El aumento del pHi decrece la actividad de GC y eleva la actividad de la Adenilato Ciclasa (AC) que produce cAMP, el cual abre el anteriormente activado HCN. Esta apertura permite la entrada de sodio (dNa) lo cual repolariza el potencial de membrana. La repolarización abre los canales HVA y LVA previamente activados, esta apertura provoca el aumento de calcio intracelular (dCa).

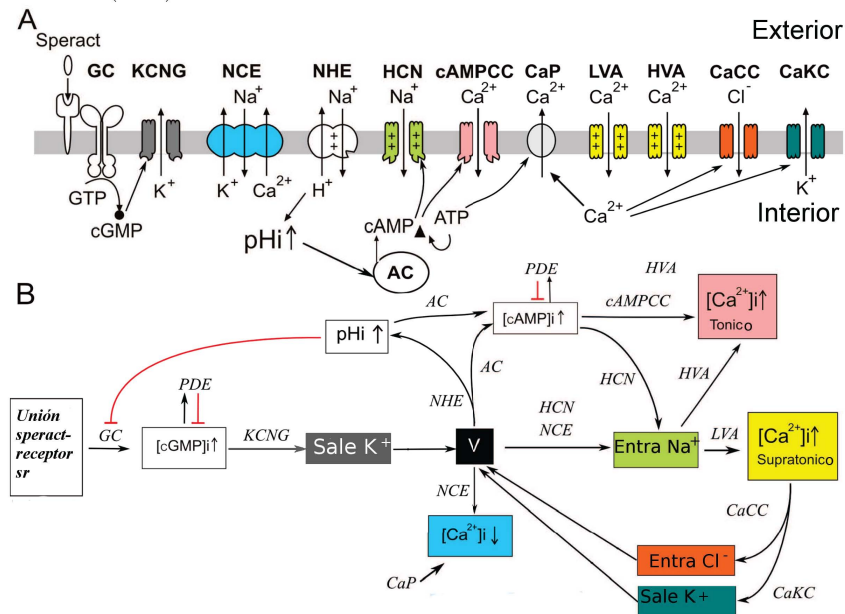


Figura 5. Vía de señalización en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar activada por spermact. A) Dibujo de los componentes involucrados en la cascada que produce las oscilaciones de calcio en el flagelo. B) eventos generados por los componentes de la vía.

Para que el ciclo se reinicie se necesita una nueva hiperpolarización, la cual es producida por una nueva salida de potasio y una entrada de cloro mediante canales de potasio y de cloro dependientes de calcio (CaKC y CaCC) que se abren cuando el calcio intracelular aumenta. Para mantener los niveles basales de calcio es necesario que el flagelo cuente con mecanismos de expulsión de calcio, éstos son las bombas de calcio (CaP) y el NCE previamente mencionado. Este mecanismo se repite cíclicamente generando las oscilaciones de calcio que provocan los cambios de simetría en el flagelo.

Un aspecto importante que hay que mencionar es el hecho del tiempo que tarda la vía de señalización en llevarse a cabo. Desde la detección de speract a la primera vuelta pronunciada, transcurren alrededor de 0.5 segundos, por lo que cada evento dentro de la vía dura algunas decenas de milisegundos. La duración de cada evento de activación e inactivación es conmensurable con los demás. Este hecho es relevante para la elaboración del modelo. Se expondrá con mayor detalle en los capítulos siguientes.

Dentro de este trabajo, se pretende estudiar el sistema previamente descrito por medio de redes lógicas, puesto que solamente se necesita conocer la naturaleza activadora o inhibidora de los componentes del sistema. Con esta aproximación (redes discretas), podemos observar comportamientos globales del sistema, tales como la dinámica a tiempos largos, el efecto de eliminar algún elemento de la vía, etc. Todo este tratamiento se explicará con mayor detalle en las próximas páginas.

Capítulo 2

El Modelo Discreto

En este capítulo, se describirán características generales de los modelos donde el tiempo y el estado de las variables es discreto, se justificará el hecho de construir esta red lógica, profundizando en la falta de información sobre algunos parámetros. Describiremos la regla de actualización con el significado de cada elemento en la ecuación. Expondremos la razón por la cual esta red en particular presenta nodos con tres estados, explicaremos la forma de construir de una tabla de verdad a partir de datos experimentales. Explicaremos cómo se construye una red lógica con base en lo anterior, abordaremos algunos conceptos como estados transitorios y atractores. Finalmente, expondremos los resultados obtenidos por medio de simular la dinámica de nuestra vía de señalización, tanto las corroboraciones que se tuvieron con experimentos previos, como las predicciones hechas a partir de la eliminación de nodos antes no observados.

2.1 Tipos de Modelos

El modelado en Biología se vale de distintas herramientas, tanto matemáticas como computacionales para intentar describir los procesos en los seres vivos. Los modelos teóricos tienen diversos componentes, aunque en general, se constituyen por: un conjunto de elementos, el estado de cada elemento, las relaciones entre ellos y la forma en que evoluciona el sistema en el tiempo o el espacio. Cada uno de estos constituyentes se puede estudiar de diversas formas, es decir, la manera en que se miden o se estudian nuestras variables puede ser diferente. A continuación una breve explicación al respecto:

- **Modelado Discreto:** donde el sistema se representa por medio de una red lógica, las variables o nodos de la red toman un número finito de valores y el tiempo se mide en unidades discretas. Este tipo de modelos comprenden los autómatas celulares, las redes booleanas y su generalización, las redes lógicas. En esta clase de modelos no es necesario conocer con profundidad los detalles moleculares de los elementos que componen el sistema, sino más bien la naturaleza activadora o inhibidora de los elementos [6]. Con este tipo de aproximaciones se pueden caracterizar comportamientos cualitativos. La dinámica de estas redes sigue una ecuación de la forma

$$\sigma_n(t+1) = f_n(\sigma_{n_1}(t), \sigma_{n_2}(t), \dots, \sigma_{n_k}(t))$$

donde $\sigma_n(t+1)$ representa el estado de cualquier elemento de la red en el tiempo $t+1$; $\sigma_{n_k}(t)$ representa cualquiera de los k reguladores del nodo σ_n al tiempo t . Finalmente, f_n representa la función discreta del nodo σ_n . Debido a que el trabajo se basa en esta ecuación, se explicará con mayor detalle este formalismo en las páginas siguientes.

- **Modelado Semi-continuo:** Aquí el tiempo es continuo y el valor de las variables que lo conforman son continuas, sin embargo, este formalismo se basa en las mismas reglas lógicas que en el modelado discreto, con la diferencia de que se resuelve una ecuación diferencial para definir el estado de cada nodo. La ecuación es de la forma

$$\frac{d\sigma_n}{dt} = \alpha_n \left(f_n(\sigma'_{n_1}(t), \sigma'_{n_2}(t), \dots, \sigma'_{n_k}(t)) - \sigma_n(t) \right)$$

donde α es un parámetro que indica el tiempo de activación del nodo σ_n . La tilde de $\sigma'_{n_k}(t)$ simboliza el hecho de que la variable se tiene que volver discreta para resolver la ecuación diferencial (utilizando un valor umbral, donde

valores superiores a dicho umbral adquieren el valor del entero superior, valores inferiores permanecen con el valor entero actual). A esta dinámica se le conoce como lineal por tramos, ya que el valor de σ_n es constante por pedazos. Un ejemplo de este formalismo es la dinámica de Glass [15]. Dicha metodología se utilizó para modelar la vía de señalización que estamos utilizando en este trabajo (Verduzco, 2012. Datos no publicados). Con el modelado semicontinuo se puede obtener resultados que se comparan mejor a un experimento, ya que el tiempo y el valor de las variables se vuelven continuas, sin embargo, es necesario conocer los parámetros que generan la dinámica esperada.

- Modelado Continuo: tanto variables como tiempo son continuos y la dinámica viene descrita por medio de ecuaciones diferenciales ordinarias, ecuaciones estocásticas, dinámica molecular, etc. Para estos modelos, es necesario conocer en forma detallada al sistema, contar con tasas de reacción entre los elementos, conocer las concentraciones a las cuales se lleva a cabo la reacción, las tasas de asociación y disociación de cada componente, etc. Estos sistemas, pese a ser de mucha mayor precisión y de mejor resolución, la cantidad de información necesaria para completar un modelo continuo en tiempo y espacio es mayor que en los modelos discretos o semicontinuos y, muchas veces, no está disponible o es difícil obtenerla. Cabe señalar que también existen sistemas de ecuaciones diferenciales que describen de manera únicamente cualitativa, por ejemplo SQUAD ().

Ante la falta de información sobre la cinética de varios de los componentes de la vía de señalización activada por speract en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar (y con miras a determinar comportamientos sistémicos), el modelo que en este trabajo empleamos es el modelo discreto, usando una generalización de una red booleana, la cual vamos a ir describiendo en las páginas siguientes.

2.2 La Red

La formulación discreta que empleamos para la dinámica generada por speract en el flagelo del espermatozoide se basa en trabajos previos relacionados con el modelaje de la dinámica de redes regulatorias genéticas [16, 17, 18, 19, 20]. En ese contexto, ha quedado demostrado que con redes lógicas es posible reproducir cualitativamente resultados experimentales a partir de conocer aspectos básicos de las interacciones entre los elementos, por ejemplo, si son de naturaleza

activadora o inhibidora [6]. La virtud de esta descripción de grano grueso, la cual muestra comportamientos esenciales y que pone de manifiesto propiedades globales, es que no se requiere del conocimiento preciso de parámetros experimentales de difícil determinación. La red regulatoria correspondiente a la vía de señalización de la Fig. 5 se ilustra en la Fig. 6.

La red que presentamos es una generalización de redes booleanas desarrolladas para estudios en redes genéticas, conocidas como redes de Kauffman [19]. Este tipo de redes está constituida por un conjunto de n variables discretas

$$\{\sigma_1, \sigma_2, \dots, \sigma_n\}$$

donde cada una de ellas, representa el estado un elemento de la red, que a partir de ahora le llamaremos nodo. Cada nodo, tendrá elementos que lo regulan y a su vez será regulador de otros elementos. La dirección de las flechas en la figura indica la precedencia de los reguladores. A las flechas que llegan a un nodo se les denomina entradas o “inputs” y a las que salen del nodo se les llama salidas o “outputs”. Cada variable σ_n tomará valores discretos para indicar su “estado dinámico”, es decir, el valor que toma dependiendo de sus reguladores. En redes booleanas, los valores que puede tomar un nodo son 0 si está apagado y 1 si está prendido. Para la vía de señalización que estudiamos consideramos 22 nodos, 18 binarios (con dos estados posibles: 0 y 1) y 4 con la posibilidad de tres estados: 0, 1 y 2.

EL VOLTAJE: El potencial de membrana (voltaje) en la célula, se puede entender como la diferencia de cargas entre el interior y el exterior celular. Generalmente, el interior es más negativo que el exterior. Para el caso del espermatozoide de erizo de mar, el voltaje (al interior de la célula) es de -45 milivoltios (mV) [14, 4, 21, 22, 11]. Este voltaje es el que se considera basal.

Al entrar cargas negativas o salir cargas positivas de la célula, el voltaje al interior de la misma se vuelve más negativo. A este estado se le denomina hiperpolarizado. Finalmente, cuando entran cargas positivas (o en su caso, salieran cargas negativas), el voltaje al interior de la célula se vuelve más positivo, proceso denominado depolarización.

En nuestra red lógica, el estado de reposo corresponde al valor 1, cuando se tiene la membrana hiperpolarizada, le corresponde el valor 0; el valor de depolarización es el 2.

CANALES DE CALCIO VOLTAJE-DEPENDIENTES: HVA Y LVA: Existe una gran variedad de canales iónicos, de muy diversas características, dependiendo del ion al que son más permeables, del tamaño de su poro, si presentan o no dependencia de voltaje, pH_i, segundos mensajeros, etc. En el caso de los canales de calcio voltaje-dependientes, se activan a determinados potenciales de membrana [23].

Los canales HVA (del inglés HIgh-Voltage Activated) se abren a voltajes más elevados que los canales LVA (de Low-Voltage Activated). Sin embargo, ambos canales comparten una característica: presentan 3 estados funcionales: canal abierto, cerrado e inactivo. El canal en el estado abierto permite el paso del ion calcio al interior de la célula (la cantidad de calcio externo es mucho mayor que el calcio interno). Los estados cerrado e inactivo no permiten el paso de calcio. La diferencia entre estos dos estados (cerrado e inactivo), es que para pasar al estado abierto, es necesario pasar primero por el estado inactivo y luego por el cerrado. Una analogía a este mecanismo es el tener una puerta cerrada con llave, (semejante al estado inactivo), cerrada pero sin llave (estado cerrado) y finalmente la puerta abierta.

Para nuestro modelo, el canal en el estado inactivo está determinado por el valor 0, el estado cerrado corresponde al valor 1 y el estado abierto al 2.

EL ION CALCIO: Como se explicó en líneas anteriores, así como se observa en la figura 3, la dinámica del calcio en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar, presenta dos componentes: una componente tónica o aumento sostenido

y una componente fásica o fluctuaciones superimpuestas a esta tónica. Para nuestro modelo, el calcio basal, es decir, el que se mide previo a la adición de speract, corresponde el estado 0, al incremento tónico le corresponde el estado 1 y a los picos de calcio le corresponde el estado 2.

2.4 Construcción de la dinámica de una red lógica

Los dos aspectos fundamentales de una red son su estructura y su dinámica. La estructura se refiere a la forma en que los nodos están conectados entre ellos, el tipo de interacción que presentan, el número de elementos y enlaces, etc. La dinámica de una red se refiere a la manera en que la red evoluciona a lo largo del tiempo, es decir, la forma en la que los nodos de la red van cambiando de estado dependiendo de los estados de sus nodos reguladores.

Lo primero que se necesita para modelar la vía de señalización de calcio activada por speract en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar, es establecer la estructura de la red, es decir, la forma en la que los nodos se conectan entre sí.

Se realizó una búsqueda en la literatura existente, así como una constante comunicación con el grupo experimental para lograr establecer las conexiones pertinentes. Es este punto el más delicado e importante de todo el trabajo, ya que la herramienta para modelar la vía de señalización, depende totalmente de la forma en la que se conectan los nodos y de la forma en que cada uno de ellos es regulado por otros nodos que son parte de la red.

2.4.1 Dinámica de la red

Como se explicó previamente, el estado de cada nodo, que denotamos como σ_n , está determinado por la función discreta

$$F_n(\sigma_{n_1}(t), \sigma_{n_2}(t), \dots, \sigma_{n_k}(t))$$

que depende del estado de los k reguladores del nodo, es decir, los “inputs” conectados a σ_n . Para cada nodo, su función correspondiente se construye tomando en cuenta la naturaleza activadora o inhibidora de sus reguladores. Como ejemplo presentamos la tabla reguladora del AMP cíclico (cAMP) (tabla 1), el cual es un segundo mensajero que recurrentemente interviene en los procesos celulares y un componente de nuestra red (Fig. 7).

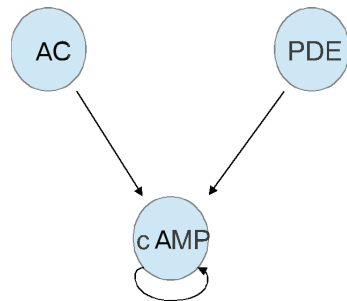


Figura 7. Interacciones de cAMP con sus reguladores. Las flechas tienen el mismo código que en la figura 6. Cada nodo se conecta con su elemento regulado. Se muestra la auto-regulación del cAMP.

Se sabe que el cAMP se sintetiza a partir de la enzima Adenilato Ciclasa (AC) [24], por lo tanto, si pensamos que en el tiempo $t=0$ no hay cAMP pero sí está activa la Adenilato Ciclasa, es decir que el estado de AC es 1, en el tiempo $t=1$ el cAMP cambiará su valor de 0 a 1. Por otra parte el cAMP es degradado por enzimas llamadas fosfodiesterasas (PDE). Entonces, si las PDE están activas a un tiempo determinado, en el paso de tiempo siguiente el cAMP tomará el valor 0 sin importar su estado anterior. En este caso sucede que las PDEs tienen más peso como reguladores negativos o inhibidores que la AC como regulador positivo o activador. Finalmente, si no hay AC, ni PDEs, pero había previamente cAMP, el nodo permanecerá en el estado 1. La función regulatoria se construye incorporando los criterios anteriores en una tabla de regulación (al estilo de una tabla de verdad) considerando todas las combinaciones de los nodos reguladores, tal como se muestra en la Tabla 1. El resto de las tablas reguladoras de cada nodo de la red se encuentran en la liga de internet <http://www.fis.unam.mx/research/seaurchin/discrete>, así como en el anexo de la presente tesis.

La construcción de las tablas de verdad es un aspecto esencial de nuestro modelaje, resultante de la incorporación meticulosa de información experimental. Algunas tablas son mucho más elaboradas que la de 8 configuraciones de entrada que presentamos para el cAMP. Por ejemplo, para el caso de la concentración del ión calcio, participan 7 nodos reguladores, 3 de ellos con 3 estados, por lo que se tienen que considerar 432 combinaciones posibles, cada una de ellas correspondiente a un estado dinámico de los reguladores.

Tabla 1. Función reguladora del cAMP. La primera fila muestra el nombre abreviado de los reguladores del cAMP y las columnas muestran el estado de los reguladores al tiempo t . La columna de la derecha muestra el estado que tomará el cAMP en el tiempo $t + 1$, si sus reguladores están en el estado correspondiente.

AC(t)	PDE(t)	cAMP(t)	cAMP($t + 1$)
0	0	0	0
0	0	1	1
0	1	0	0
0	1	1	0
1	0	0	1
1	0	1	1
1	1	0	0
1	1	1	0

Una vez construida la tabla regulatoria de cada nodo, la dinámica de la red está dada por la regla de actualización

$$\sigma_n(t+1) = F_n(\sigma_{n_1}(t), \sigma_{n_2}(t), \dots, \sigma_{n_k}(t))$$

Cabe mencionar que en este formalismo, la regla de actualización es síncrona, es decir que todos los nodos se actualizan al mismo tiempo. El modelado síncrono se utilizó porque el objetivo de este trabajo es describir de modo cualitativa la dinámica del sistema. El formalismo síncrono lo permite.

Partiendo de una condición inicial tomada al azar, una red discreta atraviesa por una serie de estados transitorios hasta que alcanza un patrón de configuraciones que se repite llamado *atractor* [25, 26, 6]. Al número de configuraciones que participan en un atractor se le llama *periodo del atractor*. Cuando se llega a una configuración fija decimos que es un atractor de periodo uno. Pueden coexistir atractores de distinto periodo. Al número de condiciones iniciales que llegan a un atractor dado se le llama *cuenca de atracción*. En redes genéticas se ha podido relacionar a los atractores de una red con diferentes tipos celulares: hepatocitos, neuronas, células sanguíneas, etc. [19], esto se debe a que un atractor representa un patrón estable de expresión genética. En la red bioquímica que aquí nos ocupa, los atractores de la red corresponden a las oscilaciones de calcio intracelular que dan lugar a reorientaciones en las trayectorias descritas por el espermatozoide [6].

2.5 Resultados

2.5.1 Evolución de la red

Iniciando con un estado en el que todos los nodos están en su estado apagado excepto el speract, lo cual correspondería a un estado basal, la dinámica de la red pasa por cierto número de estados transitorios hasta que alcanza un atractor de periodo 4, es decir, que cada 4 pasos se repite la misma configuración (Fig. 8a). La figura 8a muestra la dinámica de la red para una condición inicial particular, sin embargo, partiendo de cualquier condición inicial, el sistema llega a dos únicos atractores: el que se mencionó de periodo 4 y uno de periodo 8.

2.5.2 Corroboraciones experimentales

Como se mencionó anteriormente, con este tipo de formalismos es posible corroborar experimentos previos al eliminar nodos y dejar evolucionar la red resultante, eliminar un nodo implica dejar en valor 0 a dicho nodo durante toda la dinámica, es decir que, independientemente del estado de sus reguladores, el nodo siempre estará apagado. De este modo, la red presenta una dinámica con un nodo “ausente”.

- Sin speract la vía de señalización permanece en su estado basal. Eliminando el nodo correspondiente al speract, cualquier condición inicial termina en un estado donde los nodos permanecen apagados, incluyendo el calcio, de este modo se confirma el papel del speract como el disparador de la cascada de señalización.

- El ion potasio (K^+), es el principal catión intracelular, es decir, es el ion más abundante dentro de la célula. La diferencia de concentración entre el interior y el exterior es grande. Mientras que en el interior de la célula, la concentración de potasio es aproximadamente 100 mM, en el exterior es aproximadamente de 1mM. Como se mencionó al explicar la vía de señalización, el primer evento de la vía que cambia el potencial de membrana es la apertura de un canal de potasio dependiente de cGMP; su apertura genera la salida de potasio por diferencia de concentraciones entre el medio interno y externo. Se ha observado que al adicionar al medio la misma concentración externa de potasio que en el interior del espermatozoide, desaparecen las oscilaciones de calcio debido a que no hay flujo del ión potasio que hiperpolarice el potencial de membrana [5, 6, 57, 4]. Este mismo efecto se obtiene al eliminar el nodo

correspondiente al potasio (dK) de la red (Fig. 8b).

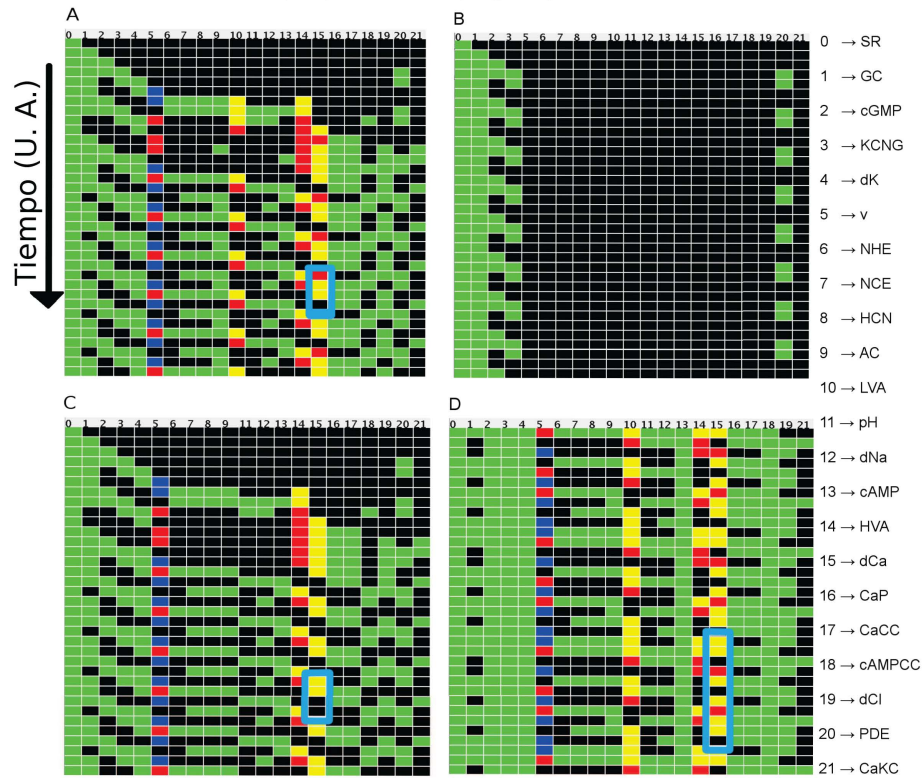


Figura 8. Dinámica de la vía de señalización. Curso temporal de los patrones de actividad bajo distintas variantes de la red. En todos los casos el tiempo corre hacia abajo y los nodos de la red están dispuestos horizontalmente, representados con los cuadros coloreados de acuerdo a su estado de activación: Para los nodos binarios negro es inactivado y verde es activado. Para los nodos ternarios, en el caso del voltaje negro representa el potencial de membrana basal, azul hiperpolarizado y rojo depolarizado. Para los canales HVA y LVA, negro es inactivo, amarillo es activo y rojo es abierto. Para el Calcio (15) negro es concentración basal, amarillo es aumento tónico y rojo es aumento fásico o supratónico. A) Dinámica de la red con todos los nodos presentes. El tamaño del periodo es 4 (indicado con un cuadro azul en el nodo 15). Corroboraciones experimentales B) Eliminación del potasio (dK) destruye las oscilaciones de calcio. C) Eliminación del canal LVA desaparece la respuesta supratónica (rojo) del calcio aunque el periodo se conserva. D) Eliminación de las fosfodiesterasas (PDE) generan dos eventos supratónicos en un periodo de 11 pasos, siendo $2/11$ un número menor de eventos supratónicos que $1/4$ como en el caso a). A la derecha se encuentran las abreviaturas usadas para el modelo. En cada caso un cuadro azul encierra el periodo del atractor en el nodo correspondiente a calcio.

- Se cree que los canales de calcio voltaje-dependientes de bajo umbral (LVA) son los encargados de generar la respuesta fásica del calcio en el flagelo

del espermatozoide [4], es decir, su apertura provoca la entrada de los iones calcio que producen las fluctuaciones que generan los cambios de curvatura en el flagelo del espermatozoide. Si eliminamos el canal LVA de nuestra red la respuesta fásica desaparece totalmente (Fig. 8c).

- Como se mencionó anteriormente, las fosfodiesterasas (PDEs) disminuyen los niveles de cAMP y cGMP [4, 21]. Existen diversos tipos de bloqueadores de PDEs. Al usar estos bloqueadores la respuesta de calcio se ve considerablemente disminuida. Una forma que se tiene para comparar el cambio en la concentración del calcio con respecto al patrón original (Fig. 8a) es la razón entre el número de picos (cuadros rojos) y el tamaño del período del atractor. Originalmente el atractor tiene un pico por cada 4 pasos de tiempo, por lo tanto su razón de eventos fásicos en un periodo es de $1/4$, en cambio la red con el nodo de las PDEs eliminado presenta una razón de eventos fásicos de $2/11$.

2.5.3 Predicciones

Una de las motivaciones fundamentales de la implementación de modelos en biología (y en cualquier otra rama del conocimiento) es la de poder predecir comportamientos que posteriormente puedan ser sujetos de una corroboración experimental. Si dicha predicción es corroborada con nuevos experimentos se logra un avance en nuestro conocimiento del sistema bajo estudio, con lo cual se adquieren nuevos elementos que pueden ser implementados en modelos posteriores. De este modo se va construyendo una imagen más completa de la naturaleza del fenómeno que se está observando.

Una manera de comparar de forma más precisa el modelo con los experimentos es promediar el valor del nodo correspondiente al calcio durante su dinámica, ya que de este modo, el calcio adquiere valores continuos, tal como en los experimentos.

- Canal de calcio de alto umbral: Un resultado importante del análisis de la dinámica de la red es que la eliminación del canal de calcio de alto umbral (HVA) retrasa el inicio de la componente fásica que antecede a las oscilaciones de la concentración del ión calcio. Si en el modelo fijamos un umbral para asumir un evento supratónico del calcio en cualquier valor entre 0.8 y 1, el tiempo en que la red WT llega a un pico de calcio, es siempre antes que la red sin HVA. Basados en esta predicción se realizaron en nuestro grupo experimentos utilizando verapamil, un bloqueador de canales HVA, donde se observa que la aparición de la primera fluctuación en el calcio tarda más en espermatozoides

tratados con el bloqueador que en los originales (Fig. 9A, B).

- Canal de potasio regulado por calcio: Desde hace algunos años se han realizado experimentos utilizando ácido niflúmico, un bloqueador de canales de cloro dependientes de calcio (CaCC). Este bloqueador provoca un aumento en el periodo del calcio y genera picos de calcio mayores, así como un aumento en la periodicidad de la curva de calcio y en la media de la concentración de calcio intracelular [4, 21, 22]. Sin embargo este bloqueador no es específico, se sabe que también actúa sobre otros blancos, como canales de potasio dependientes de calcio (CaKC) [22]. Si eliminamos de la red el CaCC no se observan cambios en el periodo y en la concentración de calcio, el periodo sigue siendo 4 y el patrón de calcio es el mismo; en cambio, eliminando el CaKC de la red el calcio tiene 3 eventos supratónicos dentro de un periodo de tamaño 8 (Fig. 10). Por lo tanto, eliminando el CaKC se observa el mismo efecto en la red que al agregar ácido niflúmico. Para corroborar esta predicción se utilizó un bloqueador llamado iberiotoxina, un inhibidor específico de canales CaKC.

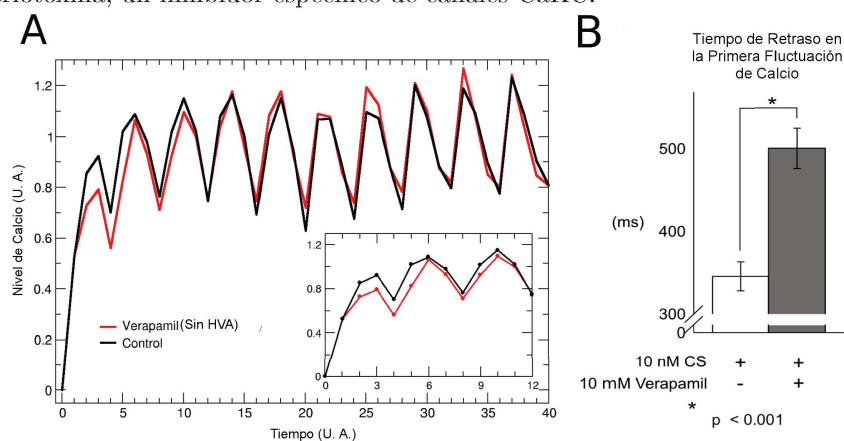


Figura 9. Predicción del efecto de eliminar canales HVA del Modelo. A) Evolución Temporal del nivel de calcio promediado tomado para cada paso de tiempo sobre 100 000 condiciones iniciales aleatorias con todos los nodos presentes (negro) y sin HVA (rojo). En este caso el nodo correspondiente al calcio se inicia en valor 0. Sin embargo, independientemente de la condición inicial, el retraso se mantiene. El inserto muestra cómo el aumento de calcio empieza después con HVA eliminado. B) Tiempo de retraso de la primera fluctuación de calcio, obtenido de manera experimental en condiciones con speract (blanco) y al agregar verapamil (gris). Nótese cómo el retraso es mucho mayor en la barra gris.

Al realizar el experimento, el efecto en el flagelo del espermatozoide fue aumentar el tiempo entre picos de calcio (como en el modelo). Sin embargo, la concentración de calcio durante los picos fue menor en el experimento con

iberiotoxina, (opuesto a lo que se observó en el modelo). Debido a que la disminución en la concentración de calcio era contrario a lo que se esperaba, se estudió más a fondo la participación del canal CaKC en la disminución de la concentración media de calcio. Sin embargo, con este trabajo se comprobó por primera vez la participación del canal CaKC, ya que en estudios previos había sido solamente sugerido[22]. Todo el tratamiento de CaKC en la red se verá en capítulos posteriores.

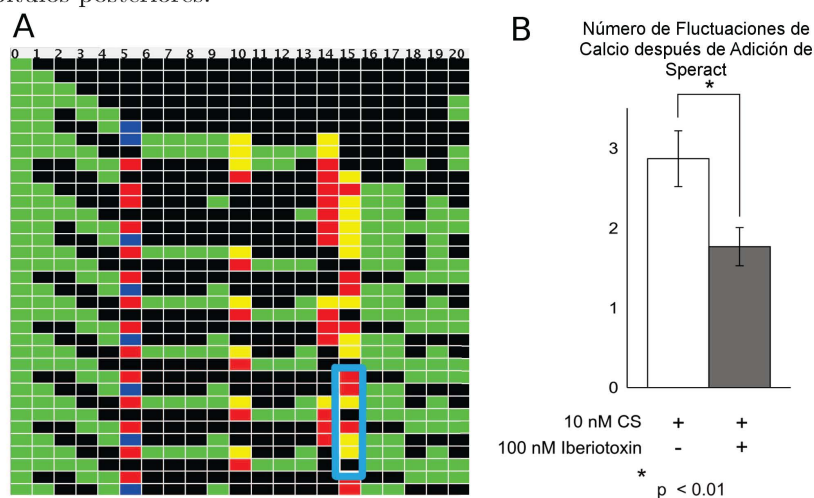


Figura 10. Predicción de la participación de canales CaKC en la vía de señalización activada por speract. A) Evolución de la red al eliminar canales CaKC. Nótese en el recuadro azul el aumento en la periodicidad del estado estacionario, al pasar de 4 pasos a 8 en las mismas condiciones. B) Número de oscilaciones de calcio dentro de los primeros 5 segundos después de la adición de speract en condiciones de sólo speract (blanco) y con iberiotoxina (gris). Nótese que el número de fluctuaciones de calcio es menor en el caso con iberiotoxina.

Por cada nodo de la red, su eliminación correspondiente tuvo efectos en la dinámica. Se abordarán más a fondo dichos efectos en capítulos posteriores. Sin embargo, estos resultados muestran la relevancia del modelado discreto para identificar los elementos que generan las oscilaciones de calcio en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar tras la detección de speract.

Capítulo 3

Efecto *in silico* de fármacos multi-blanco

En este capítulo, justificaremos la importancia de estudiar fármacos multi-blanco en general, señalaremos la importancia del ácido niflúmico en la dinámica de calcio y en el movimiento del espermatozoide. Profundizaremos en la metodología que se siguió para conseguir los resultados experimentales previamente obtenidos para así dar lugar a una explicación de cómo el ácido niflúmico afecta de manera diferenciada cada nodo sensible a él.

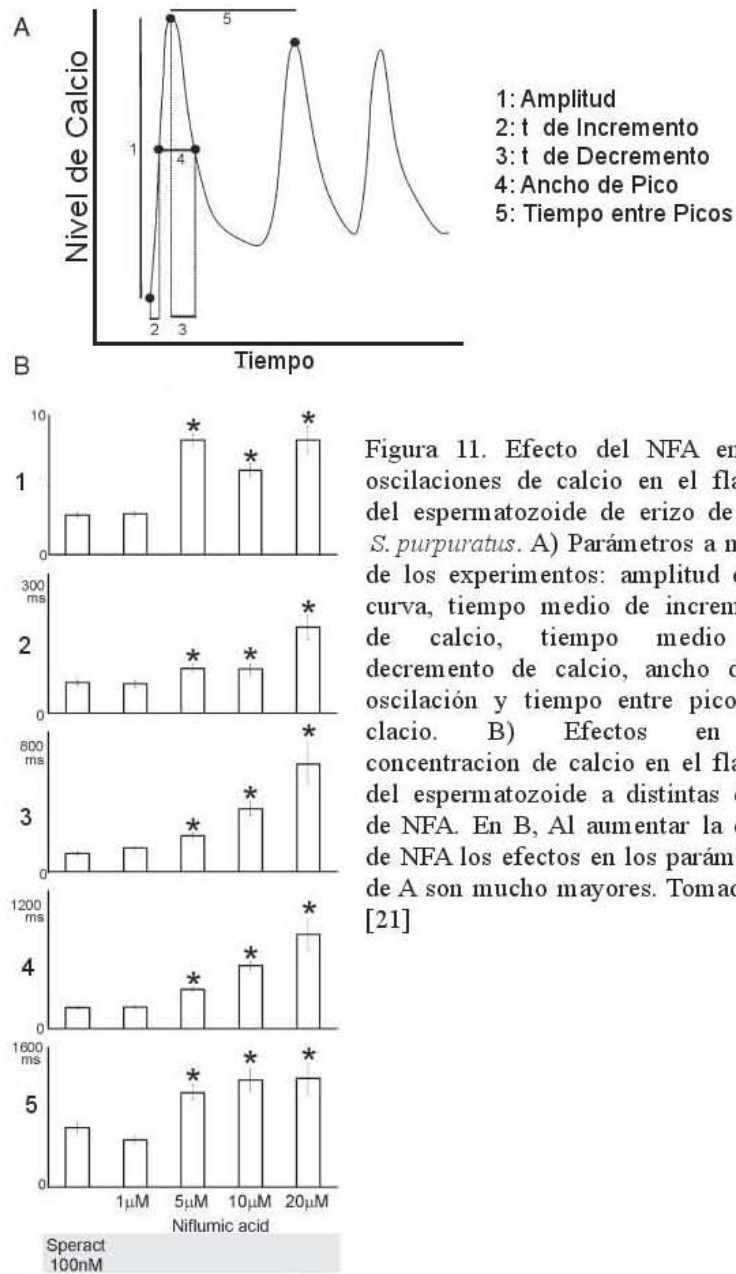
3.1 Motivación

Uno de los mayores retos en la ciencia actual es entender los efectos de fármacos que tienen más de un blanco, que son la gran mayoría. Dilucidar de alguna manera la forma en que una droga puede afectar una molécula u otra, nos permite hacer medicamentos de una manera más eficiente y determinar de forma más precisa los efectos colaterales que se puedan presentar en general.

El ácido niflúmico (NFA por sus siglas en inglés), es una droga antiinflamatoria no esteroidea. Este fármaco bloquea o modifica la cinética de apertura de varios canales iónicos [27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 4, 22]. En particular, existe evidencia que NFA afecta la permeabilidad de canales de cloro dependientes de calcio (CaCC), canales de potasio dependientes de calcio (CaKC) y canales de sodio activados por voltaje y regulados por nucleótidos cíclicos (HCN). Todos estos canales están codificados dentro del genoma del erizo de mar.

En presencia de speract, los espermatozoides tratados con NFA experimentan aumentos en la concentración media de calcio intracelular, así como en la amplitud, frecuencia y pico máximo de las oscilaciones de dicho ion (Figura 11) [22, 21]. Estas alteraciones tienen profundas repercusiones en la motilidad del espermatozoide. Los giros pronunciados inducidos por speract, son mayores y se presentan en intervalos más grandes. En los espermatozoides de *L. pictus* se ha observado experimentalmente que la quimiotaxis desaparece al ser tratados con NFA [39, 40]. En *A. punctulata*, se ha descrito una situación similar, al usar NFA en presencia de su quimioatrayente resact [27].

Dentro de esta parte del trabajo, usamos nuestro modelo discreto para explorar el efecto que tiene NFA en la vía de señalización activada por speract, enfocándonos en las medidas experimentales obtenidas previamente: nivel de $[Ca^{2+}]_i$ promedio, amplitud, frecuencia y pico. Se obtuvieron in silico las medidas de $[Ca^{2+}]_i$ para el caso con todos los nodos presentes, así como bloqueando los canales que se presumen sensibles a NFA: los canales HCN, CaCC y CaKC. Los bloqueamos uno por uno, por parejas y los tres simultáneamente y finalmente comparamos éstos con las medidas anteriormente mencionadas. Calculamos las fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ promediadas sobre 10^5 condiciones iniciales aleatorias tanto para la red completa (con todos los nodos presentes) como para la red con nodos eliminados. El utilizar el promedio nos permite tener una mayor resolución y comparación con los datos experimentales.



3.2 Resultados

Como se mencionó anteriormente, al ser una red donde los nodos toman valores discretos y el total de combinaciones posibles es finita ($2^{18} \times 3^4 = 21\ 233\ 664$), la red llega a un patrón de configuraciones que se repiten entre sí. Este patrón se llama atractor. Para analizar y entender el comportamiento de la red ante el efecto de NFA, calculamos las diferencias entre los atractores generados por la red completa y la tratada con NFA, observando el número de atractores, sus cuencas de atracción y periodos. Finalmente, se realizó un análisis del espectro de Fourier de las curvas de calcio, para determinar diferencias en el comportamiento temporal entre las redes sometidas a NFA y la red control o Wild Type (WT).

3.2.1 Las fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ son moduladas por la cinética de los canales CaKC, CaCC y HCN.

3.2.1.1 Observaciones de nodos individuales

Como se puede apreciar en la figura 12 y 13, las fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ como función del tiempo, son diferentes entre la red sin alterar y las redes tratadas con NFA. Las curvas de calcio, al eliminar un nodo, presentan una dinámica particular, que resulta ser diferente de los demás casos. Así, tenemos que al eliminar HCN de red, las fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ son menores en media y pico. Eliminar CaCC produce en la red una amplitud mayor al hacer valles más profundos y crestas del mismo tamaño. Por otro lado, bloquear CaKC del sistema, genera crestas más altas, y una media de $[Ca^{2+}]_i$ mayor que en la red control. Los atractores que se obtienen con estas eliminaciones, son considerablemente distintos al caso WT en cuanto a cuenca periodo, número de atractores y la dinámica misma de la red.

Otro dato interesante es que las series no están en fase. Esto se debe a que ante la eliminación de un nodo, la dinámica cambia incluso en el tiempo en que entran al atractor las redes. Los atractores son distintos; en el caso de eliminar HCN se llega a un solo atractor de periodo 27. Eliminar CaCC genera un solo atractor de periodo 4. Esta es la razón por la cual se observa una estructura tan regular en B). Al bloquear CaKC se obtienen dos atractores de periodo 4 y 8, pero distintos al WT.

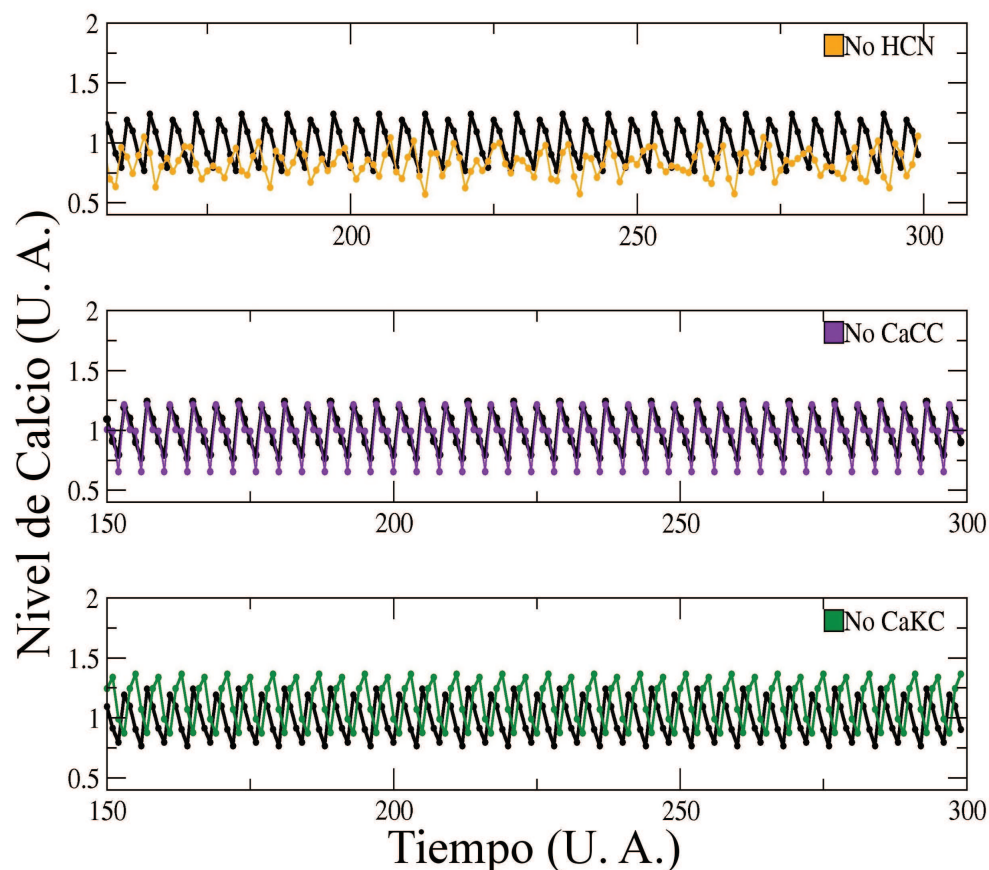


Figura 12. Evolución de calcio en el estado estacionario, promediado sobre 100 000 condiciones iniciales aleatorias. Los valores de calcio para la red completa están mostrados en negro. Para las redes con un nodo eliminado están en colores: A) amarillo para la red sin canales HCN, B) violeta para la red sin canales CaCC y C) verde para la red sin canales CaKC. Para A) nótese el aumento de la periodicidad en las fluctuaciones de calcio para la serie amarilla. En B) se puede observar el aumento de amplitud. En C) se observa el aumento en la media y el pico máximo.

3.2.1.2 Observaciones por parejas

Haciendo bloqueos combinados, Los resultados de la dinámica muestran comportamientos interesantes en cuanto al efecto aditivo que en todos los casos parece presentarse: se genera una dinámica en la red que es afectada en una forma muy similar a los casos individuales, salvo que en el caso de bloqueo doble, la modificación contiene los comportamientos de ambos bloqueos. HCN-

CaCC presenta una menor media pero una amplitud un poco mayor que en caso de bloquear solamente HCN. HCN y CaKC presentan una media menor que el WT pero mayor que HACN-CaCC. CaCC-CaKC presentan mayor media, pico y amplitud. Sin embargo, la periodicidad de la oscilación parece ser constante. (Figura 13).

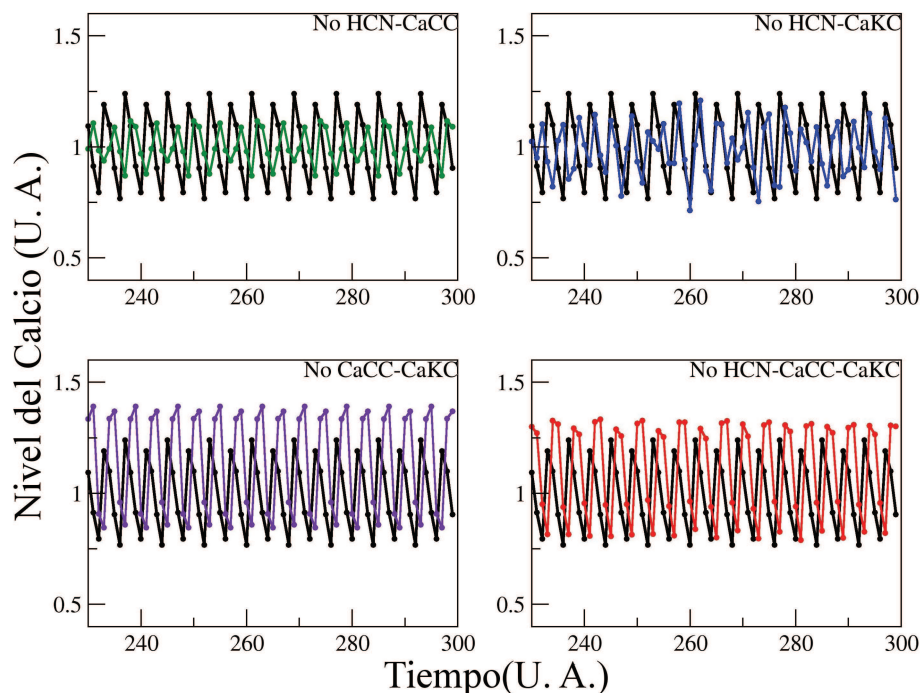


Figura 13. Evolución de calcio en el estado estacionario, promediado sobre 100 000 condiciones iniciales, comparándolo con bloqueo de pares de canales sensibles a NFA. Los valores de calcio para la red completa están mostrados en negro. A) Bloqueo de la pareja HCN-CaCC. B) Bloqueo de HCN-CaKC. C) Bloqueo de la pareja CaCC-CaKC. D) Bloqueo de los tres canales juntos. Nótese que en los casos en los que aparece HCN, la periodicidad aumenta, cuando se bloquea CaCC la amplitud aumenta, mientras que cuando se bloquean los canales CaKC lo que aumenta es la concentración media de calcio y el pico máximo.

3.2.1.3 Eliminando los tres canales sensibles a NFA

Al bloquear los tres canales sensibles a NFA, la dinámica de calcio tiene un efecto aditivo, es decir, la curva de calcio resultante contiene cada una de las características que se presentan con el bloqueo de canales individuales: la media es mayor y las crestas son más altas, igual que al eliminar el canal CaKC (Figura 12C) y la amplitud es mayor, como al eliminar el CaCC (Figura 12B).

Acerca de la periodicidad de las oscilaciones de calcio, observamos el espectro de Fourier para analizar todos los periodos oscilatorios existentes dentro de las series de tiempo de $[Ca^{2+}]_i$. El espectro de Fourier muestra un mayor número de componentes (más picos), lo cual indica la aparición de oscilaciones con periodos diferentes. Este último resultado se puede observar en la figura 14, donde analizamos la serie de tiempo entre el WT y la red con los tres nodos eliminados. Haciendo una ligera atenuación de la señal de calcio, promediando el valor del calcio durante ventanas de tiempo de un tamaño determinado, (también llamado “running average”). En el caso de esta serie en particular, primero utilizamos una ventana de periodo 4 (Figura 14C) y luego una ventana de periodo 8 (14D). Como se puede observar, las fluctuaciones desaparecen totalmente al promediar la ventana de tamaño 8 en la curva control (negra), mientras que en la tratada (roja), se mantiene una fluctuación de periodo 9. Estos resultados coinciden con el periodo de los atractores que se obtienen de la dinámica. En el caso de la red WT, los atractores son de periodo 4 y 8, mientras que en la red sin HCN-CaCC-CaKC, los atractores son de periodo 8 y 9. Al hacer el running average de tamaño 8 (Figura 14D), en el WT desaparece toda oscilación, mientras que en la tratada con NFA, la oscilación de periodo 9 se mantiene. La conclusión de este análisis es que la única manera de tener todos los resultados obtenidos experimentalmente, es eliminando los tres canales sensibles a NFA.

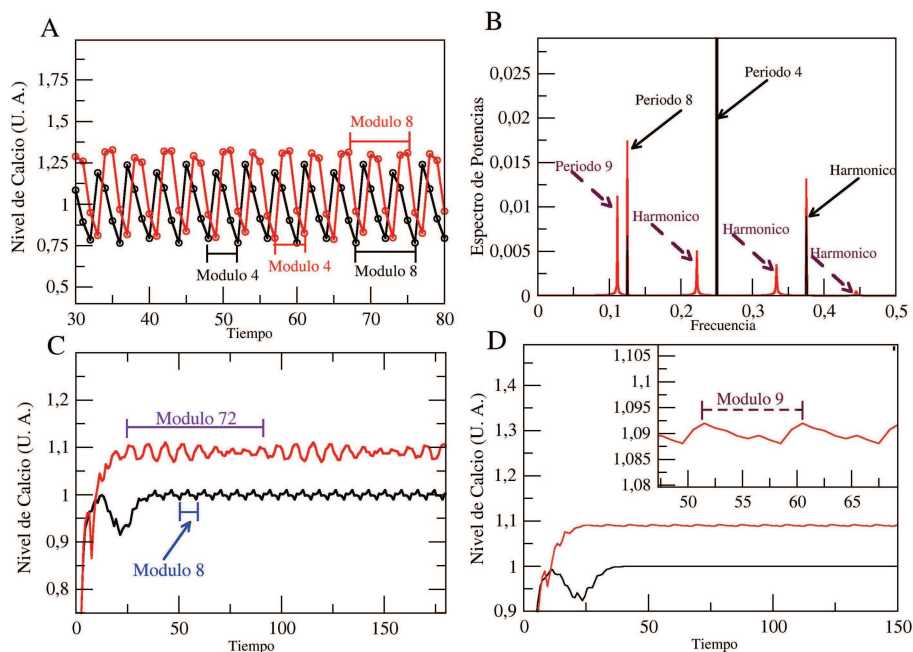


Figura 14. Efecto de eliminar los tres canales sensibles a NFA en la red. A) Evolución en el tiempo del calcio. Promedio de oscilaciones para la red control, (negro). Curvas con los nodos CaCC-CaKC-HCN eliminados están en rojo. Para la red sin alterar, se pueden identificar dos módulos, el de periodo 4 y el de periodo 8. Estos módulos se indican en la figura. B) espectros de Fourier calculados a partir de 1 000 pasos en el estado estacionario de la evolución de calcio de la figura A). Componentes de Fourier de periodo de 4 y 8 y sus armónicos se muestran en negro. Para la red tratada con NFA, el espectro se muestra en rojo, determinado a partir de mil pasos de la evolución de calcio en el estado estacionario. La periodicidad de la curva tratada con NFA es mayor, debido a la aparición de un componente de Fourier de período 9 con sus armónicos. C) Ventana promediada de tamaño 4 de la serie correspondiente a A) incluyendo el tiempo transitorio inicial, se manifiesta un módulo subyacente de periodo 8 para el WT (azul) y 72 para el módulo de NFA (violeta). Este último módulo es el mínimo común múltiplo (MCM) de componentes de Fourier de período de 8 y 9 que se muestran en B). D) Ventana promediada de tamaño 8. Aquí las oscilaciones de la red sin NFA desaparecen completamente (gráfico negro) mientras en la tratada con NFA, se observa una periodicidad de tamaño 9 (en rojo). El inserto es una ampliación que muestra este comportamiento en detalle.

3.3 Relaciones causales del bloqueo de los canales sensibles a NFA

Un resumen de todo lo descrito anteriormente, se explica en la tabla 2, donde mediante flechas se indica si el bloqueo de algún canal aumentó o disminuyó

los parámetros a estudiar. En esta tabla es claro que el único candidato a producir los mismos efectos que los obtenidos experimentalmente por [21, 22] es al bloquear los tres canales HCN-CaCC-CaKC.

Tabla 2. Compilación del efecto de NFA sobre la red.

Característica	HCN	CaCC	CaKC	HCN-CaCC	HCN-CaKC	CaCC-CaKC	Todos
Pico	↓	=	↑	↓	↓	↑	↑
Amplitud	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑
Media	↓	↓	↑	=	=	↑	↑
Modos de Fourier	↑	↓	=	↑	↑	=	↑

Las primeras tres columnas de la tabla, muestran los resultados de bloqueos individuales de los canales. Observando éstos, es posible establecer relaciones entre el efecto de un solo canal y la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$:

- El bloqueo de CaCC incrementa la amplitud de las fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$
- El bloqueo de CaKC incrementa el tamaño de las crestas de $[Ca^{2+}]_i$, así como el valor medio de $[Ca^{2+}]_i$
- La eliminación de HCN genera un comportamiento temporal mucho más elaborado.

A la luz de estos últimos resultados, se puede entender el comportamiento de las combinaciones, determinando de este modo, la dominancia de cada canal sobre la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ en la vía de señalización activada por speract. Por ejemplo, la cuarta columna de la tabla, muestra que la combinación de HCN con CaCC produce un comportamiento temporal más rico (entendiéndose por riqueza una mayor periodicidad) que en el WT, producido por la eliminación de HCN; lo mismo ocurre con la combinación de HCN con CaKC y al bloquear los tres. La participación de HCN es fundamental para la sincronización entre las oscilaciones de calcio y la natación del espermatozoide. Como ejemplo de esto, está el trabajo previo de [14], donde utilizan ZD7288, un inhibidor de canales HCN. En este trabajo se observa un cambio en el tiempo de respuesta al speract respecto al aumento del calcio en el espermatozoide de erizo de mar *S. purpuratus*.

3.4 Resolviendo una controversia

Los resultados presentados aquí hasta el momento, reflejan el efecto de eliminar ciertos canales iónicos presentes en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar. Dichos canales son conocidos por ser blancos del ácido niflúmico. La suposición que se tiene es que NFA bloquea estos canales. Recientemente, se han realizado reportes donde se observa que NFA activa los canales de potasio dependientes de calcio CaKC [34, 35]. Incorporando este nuevo resultado a nuestro modelo, el efecto de NFA en la red no es el mismo que se observa en los experimentos. Un hecho importante a resaltar es que NFA no es un bloqueador específico, es decir, puede bloquear elementos dentro de la vía de señalización que no hemos incorporado para este modelo. El candidato más pertinente para este hecho es el canal CatSper, el cual es un canal de calcio específico del espermatozoide y ha sido recientemente considerado como un quimiosensor en el esperma de humano [41]. La secuencia de este canal ha sido hallada en el genoma del erizo de mar, por lo que su participación dentro de la vía de señalización es probable. La pertinencia de esto será demostrada en capítulos siguientes.

Capítulo 4

Propiedades globales de la red

En este capítulo, se explicará lo que es el régimen dinámico de una red, posteriormente se expondrá qué es y cómo se obtiene el mapeo de Derrida, por qué es importante y contextualizarlo dentro del problema que estamos modelando. También se explicará el concepto de redundancia y por qué es importante tomarla en cuenta en el estudio de nuestra red. Abordaremos los métodos aquí usados para reducir la red iniciando con las correlaciones, siguiendo con los atractores y finalmente el mapeo de Derrida.

4.1 Régimen dinámico

Las redes discretas pueden operar en tres diferentes regímenes: ordenado, caótico y crítico [26, 42, 20]. La manera en que estos regímenes están clasificados depende de la forma en que las redes responden ante perturbaciones y de cómo se propagan dichas perturbaciones a lo largo del tiempo. En el régimen ordenado, las perturbaciones son rápidamente amortiguadas y desaparecen en el tiempo, el patrón dinámico de la red permanece inalterado. Por otro lado, en el régimen caótico, una perturbación pequeña genera grandes cambios en la dinámica de la red, alterando y transformando por completo las características dinámicas originales de la misma. Finalmente, en el régimen crítico, perturbaciones pequeñas no crecen ni decrecen en el tiempo, sino que los cambios generados por dicha perturbación permanecen más o menos constantes. El régimen crítico ha sido encontrado en una cantidad considerable de redes biológicas, desde redes genéticas hasta la actividad cerebral [25, 26, 6, 17, 43]. En las redes críticas se presentan correlaciones de largo alcance entre eventos, con lo cual se favorece la propagación de información [42, 44]. Bajo este régimen se presentan las condiciones para la confluencia de robustez y adaptabilidad[26], el sistema es estable y flexible a la vez. Se tiene la hipótesis que la ocurrencia del estado crítico en la dinámica de la red asociada a esta vía de señalización confiriera ventajas evolutivas (robustez y adaptabilidad son conceptos que abordaremos en páginas posteriores).

4.1.1 Mapeo de Derrida

Una manera de conocer el régimen en el que opera una red es el mapeo de Derrida $M(x)$, que determina, en promedio, cómo van evolucionando las distancias entre configuraciones a lo largo del tiempo. Para ello se emplea la distancia de *Hamming*, que se mide por la fracción de bits diferentes en dos cadenas binarias. En biología, un ejemplo de la utilidad de la distancia de Hamming, es la observación de la avalancha de perturbaciones generada por la eliminación de un gen dentro de una red de regulación genética, es decir, qué genes cambiaron su patrón de expresión después de haber eliminado un gen dentro de su red regulatoria.

En el mapeo de Derrida, dos configuraciones se colocan a una distancia de Hamming determinada $H(0)$ y se realiza la dinámica de la red para un paso de tiempo ($t = 1$). Posterior a este tiempo t , se vuelve a medir la distancia de

Hamming entre estas dos configuraciones ($H(t)$). Esto se repite para muchas condiciones iniciales y finalmente se grafican los promedios de $H(0)$ vs $H(t)$. La pendiente de la curva al acercarse al origen, va a determinar el régimen dinámico de la red. Cuando la pendiente es menor a 1, la red se encuentra en el régimen ordenado. Si la pendiente es mayor a 1, la red es caótica. Sin embargo, cuando la pendiente es cercana a 1, la red es crítica.

Formalmente se tiene $x(t+1) = M(x(t))$ donde $x(t)$ es la distancia promedio de Hamming al tiempo t . El régimen dinámico de la red está determinado por el valor de la pendiente del mapeo cuando $x=0$, entonces la red será ordenada si $M'(0) < 1$, caótica si $M'(0) > 1$ y la red será crítica si $M'(0) = 1$.

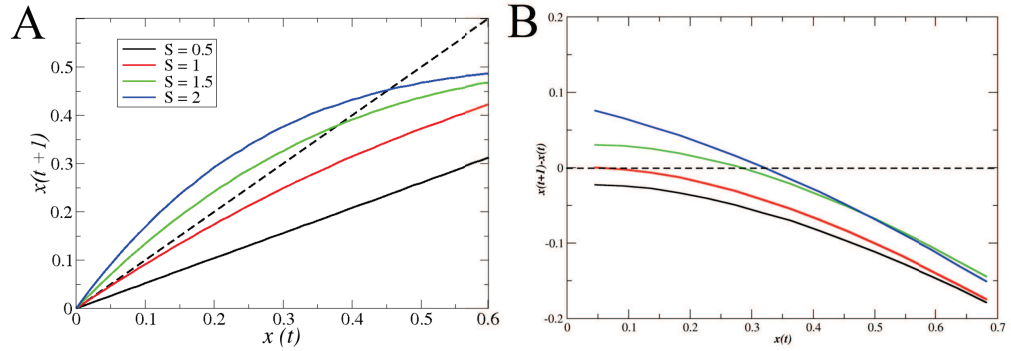


Figura 15. Mapeo de Derrida para redes booleanas aleatorias. A) En esta figura, se muestra el régimen dinámico en el que operan las redes, dependiendo de la pendiente con la que se llega al origen. La curva punteada es la identidad. La curva negra pertenece al mapeo de Derrida de una red ordenada (la pendiente $S = 0.5$). Las curvas verde y azul pertenecen a mapeos de redes caóticas ($S = 1.5$ y $S = 2$, respectivamente). Finalmente, la línea roja representa el mapeo de una red en el estado crítico ($S = 1$). Nótese que la forma en la que llega al origen prácticamente coincide con la identidad. B) Mapeo de Derrida Modificado. Este mapeo es el mismo que en A), sólo que el eje Y muestra $x(t+1) - x(t)$. Cuando la curva llega a un valor cercano a 0, es decir, cuando $x(t) \rightarrow 0$, el valor de dicha curva determinará el régimen dinámico en el que opera: ordenado si $x(t+1) - x(t) < 0$ (línea negra), caótico si $x(t+1) - x(t) > 0$ (líneas azul y verde) y crítico si $x(t+1) - x(t) = 0$ (línea roja).

4.1.2 Criticalidad

El mapeo de Derrida $M(x)$ [45] muestra que nuestra red opera en el régimen crítico ya que $M'(x) = 1 \pm 0.02$, para $x = 0$ (Fig. 16). Este es un resultado interesante, puesto que como se mencionó previamente, en las redes críticas la coexistencia entre robustez y adaptabilidad ocurre con la probabilidad más alta. Si tomamos en cuenta el hecho de que los espermatozoides de distintas

especies se encuentran una gran variedad de medios, es conveniente que la red regulatoria que produce los cambios de movimiento en el esperma sea lo suficientemente flexible para adaptarse a distintos entornos y a la vez robusta para conservar los rasgos esenciales de su estructura.

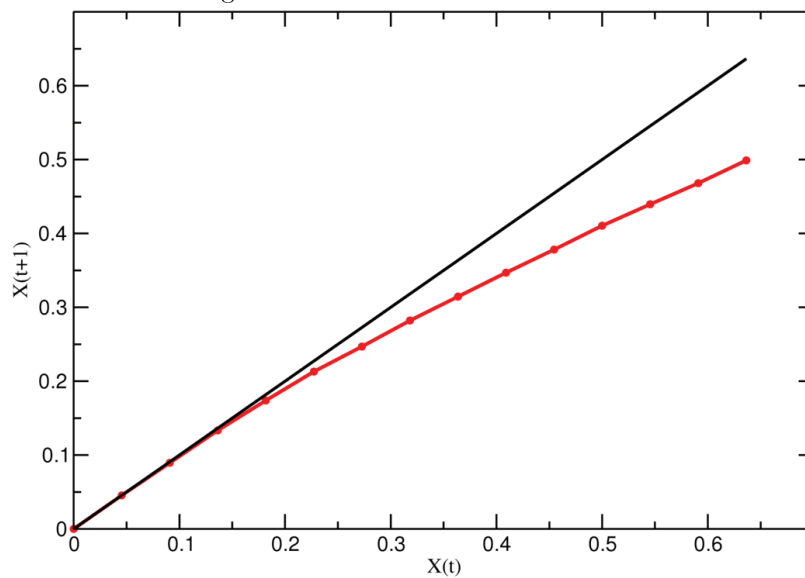


Fig. 16 Criticalidad. Esta gráfica muestra el mapeo de Derrida $M(x)$ para la red de señalización activada por speract, que relaciona el tamaño de una perturbación a tiempos consecutivos. Las iteraciones sucesivas de este mapeo convergen a un valor estacionario, que determina el régimen dinámico en que opera la red. Se inicia con una separación dada (al tiempo $t = 0$) y se obtiene la separación subsecuente (tiempo $t = 1$); esta determinación se lleva a cabo para todas las configuraciones con la separación dada inicialmente. $x(t)$ es el valor promediado del calculo anterior sobre todas las posibles configuraciones. La pendiente de este mapeo en el origen es cercana a 1, característica de una red crítica.

4.2 Redundancia

Una de las metas principales de la biología de sistemas, es construir módulos funcionales mínimos que conserven las características fundamentales del sistema y que puedan ser más fáciles de estudiar. Una manera de hacerlo es reduciendo el número de elementos del sistema observando que dichos elementos no afecten de modo significativo la dinámica.

Una manera de observar los nodos más relevantes de la red, es hacer el mapeo de Derrida eliminando un nodo de la red y determinar el régimen dinámico en el que opera la red sin dicho nodo. Si al eliminar el nodo, la pendiente de

la curva al llegar al origen es mayor a 1, es decir, que se vuelve caótica la red sin ese nodo, entonces podemos decir que dicho nodo es relevante para mantener la dinámica. Existen evidencias de que las redes biológicas pueden permanecer en el estado ordenado o en el estado crítico, mas no en el caótico [46]. En la figura 17 se muestra el mapeo de Derrida, con una modificación en los ejes para hacer más visible cada línea. Esta formulación se desarrolló por primera vez en [47]. En este caso, el eje Y muestra la distancia de Hamming $H(1)$ menos la distancia inicial $H(0)$. Por lo tanto, las líneas que estén por encima del valor 0 (Línea negra horizontal) al acercarse a $H(0) = 0$, serán los nodos relevantes al sistema, ya que eliminarlos genera una red con una dinámica caótica. Los nodos que permanecen en la nueva subred, al parecer son suficientes para mantener la dinámica general del sistema.

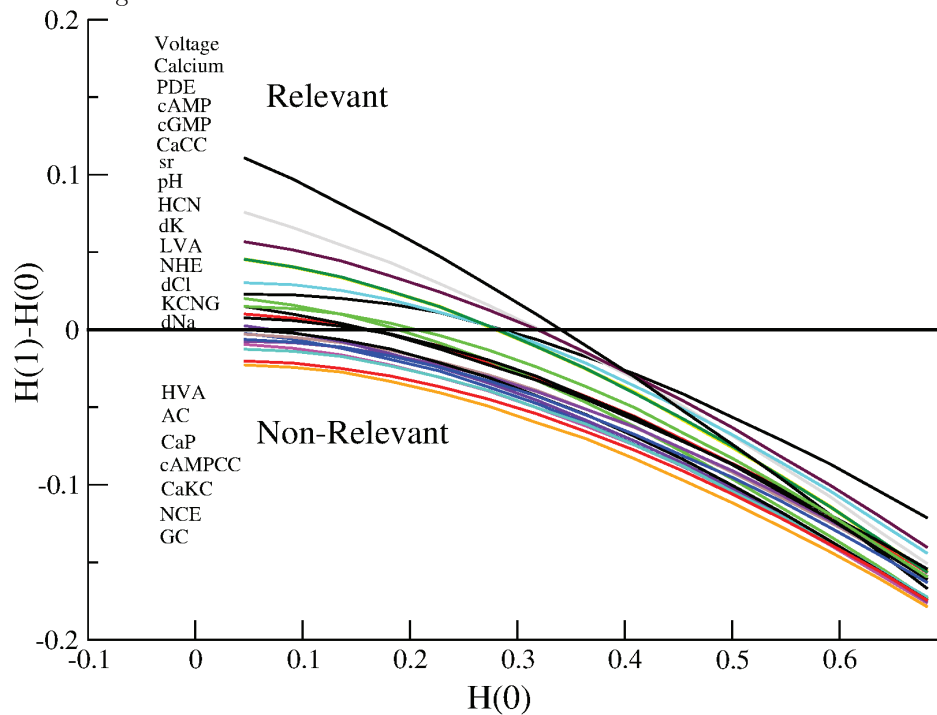


Figura 17. Mapeo de Derrida Modificado. Se mide la distancia de Hamming inicial ($H(0)$) entre dos redes, contra la distancia entre ellas un paso consecutivo después ($H(1)$). La diferencia entre $H(0)$ y $H(1)$ se grafica en el eje Y. La manera en que $H(0)$ se acerca a 0 determina el régimen dinámico en que opera la red. Curvas que se encuentran encima de la horizontal (en negro) al acercarse a valores de $H(0)=0$, son caóticas, curvas cercanas a la horizontal son críticas y por debajo de ella son ordenadas. Cuando la eliminación de un nodo genera una red caótica, decimos que el nodo eliminado es relevante para mantener la dinámica del sistema.

A partir de los nodos que permanecen en el mapeo de Derrida modificado (eliminando todos los nodos cuyo mapeo de Derrida generaba una curva debajo de 0), se reconstruye una nueva red con menos elementos (Figura 18A). Para construir esta nueva red más pequeña se tuvieron que reconectar nodos, puesto que ya no había algunos de la red anterior. Las interacciones son consistentes con la red original, las tablas son a su vez más pequeñas pero se mantiene la regulación anterior. La figura 18B, es el mapeo de Derrida para la red reducida, que se observa crítica también. En esta nueva red, se puede observar que los nodos que permanecen son suficientes para mantener las oscilaciones de calcio: el receptor a speract, los cuatro iones y un elemento para regularlos; el pH y su regulador y los nucleótidos y su regulador, PDE.

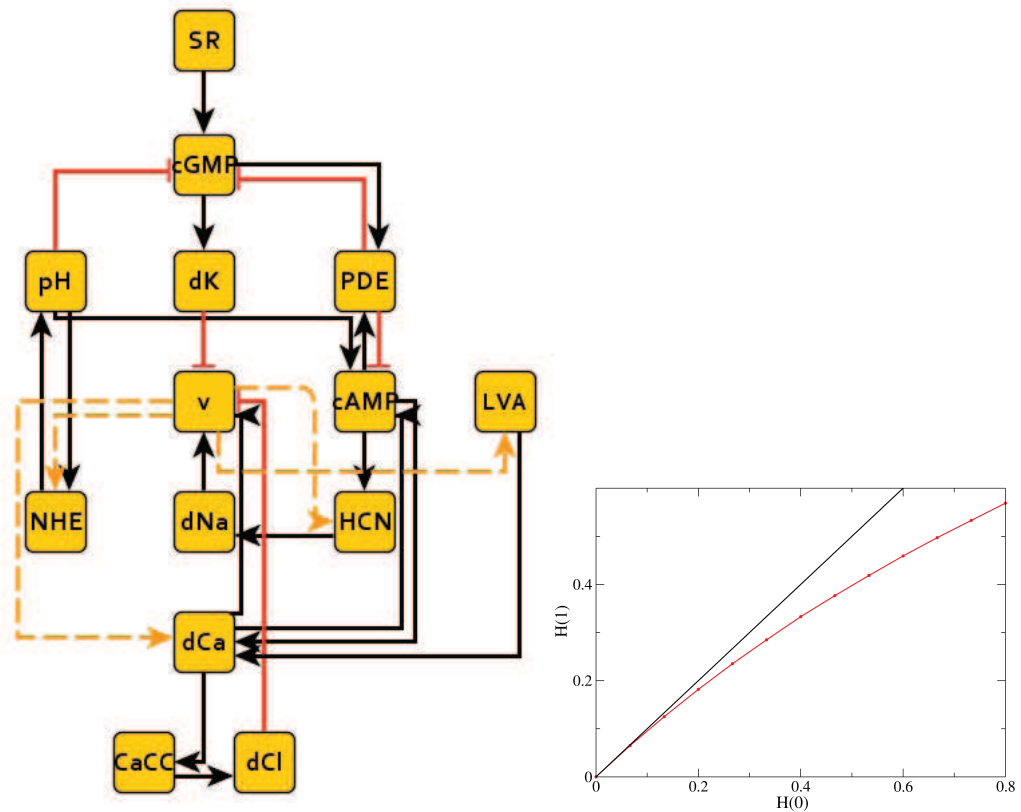


Figura 18. Reducción de la red por medio del mapeo de Derrida Modificado, A) Representación gráfica de la red reducida. El código de colores de las flechas es el mismo que en la figura del capítulo 1. B) Mapeo de Derrida para la red reducida. Como puede observarse, la pendiente al llegar al origen es prácticamente 1, lo que indica que la red es crítica también.

Capítulo 5

Refinando el modelo: el canal CatSper

En este capítulo hablaremos de cómo la existencia de ciertas inconsistencias dentro del modelo, así como datos experimentales nuevos, generaron la inquietud de integrar otro canal a la red; de los criterios que se siguieron para elegir el canal adecuado y del resultado: el canal CatSper. Hablaremos de la fisiología del canal, su importancia en mamíferos y el efecto de su ausencia. Con base en experimentos aun no publicados que apuntan a la existencia de un canal dependiente de pH_i , hipotetizaremos sobre la presencia de CatSper en el espermatozoide de erizo de mar. Expondremos la situación del canal CaKC, su modificación y su importancia, tanto en los experimentos previos como en la nueva red con CatSper incluido. Resaltaremos la concordancia de esta nueva red con los experimentos con ácido níflúmico. Ampliaremos los conceptos de robustez y redundancia en esta nueva red. Reduciremos el número de nodos de la red por medio de 3 criterios distintos y haremos las pruebas de estabilidad para la nueva red reducida. Finalmente, realizaremos un análisis de estabilidad en la dinámica, proveniente de alteraciones en la estructura de la red.

5.1 Motivación

Hasta el momento, el modelo ha arrojado resultados que están acorde con observaciones previas obtenidas experimentalmente: la ausencia de oscilaciones de calcio en varias condiciones al quitar cierto elemento de la red, el cambio en la dinámica del mismo calcio al bloquear otros componentes. Además se han hallado propiedades globales de la red como criticalidad y robustez. Sin embargo, aún existen algunas discrepancias y situaciones a resolver con respecto a ciertos resultados del modelo, por ejemplo los siguientes:

- En el capítulo 2, donde se describe el modelo y se exponen los primeros resultados de la dinámica de calcio, encontramos el caso del bloqueo del canal CaKC por medio de iberiotoxina, un potente inhibidor de estos canales. El resultado esperado a partir del modelo, era un aumento en el tiempo entre picos de calcio y un aumento grande en la concentración de calcio intracelular, reflejado en picos más altos y una concentración media de calcio mayor que en el caso WT. El resultado experimental obtenido fue un aumento en el tiempo entre picos de calcio, sin embargo en el modelo, el aumento esperado en la concentración media de calcio, así como en los picos máximos no se obtuvo, sino al contrario, la concentración era mayor en el caso control o WT que en el caso con iberiotoxina.
- En el caso del Acido Niflumico (NFA), se presentó una controversia sobre el papel que jugaba este fármaco sobre el canal CaKC. En un inicio, se pensó que el efecto de NFA sería el de inhibir la apertura del canal CaKC, sin embargo, existen evidencias experimentales de que NFA activa estos canales[34]. Al incorporar esto en el modelo, se obtuvieron algunos resultados que no coincidían con los observados experimentalmente: el periodo entre picos de calcio disminuyó con respecto al WT y la concentración de calcio era la misma en condición WT y tratada con NFA.

Uno de los eventos moleculares que ocurren en la vía de señalización de $[Ca^{2+}]_i$ activada por speract y que se está modelando es la regulación de pHi por medio del intercambiador sodio-protones (NHE). Este intercambiador es voltaje dependiente, al haber una hiperpolarización se activa, ingresando iones Na^+ a la célula y sacando protones. Esto genera una elevación del pHi, lo cual produce otros eventos que regulan la manera en que $[Ca^{2+}]_i$ fluctúa. El pHi regula la actividad de las ciclasas: adenilato y guanilato ciclasa (AC y GC, respectivamente); sin embargo, dentro de la vía de señalización podría haber

elementos regulados por el pHi que no se estaban tomando en cuenta, que participan de manera importante en la regulación de $[Ca^{2+}]_i$ y que bien se podrían modelar dentro del formalismo aquí planteado.

Datos de Nishigaki y cols. [14], mostraban que, en una población de espermatozoides de *S. purpuratus*, el pHi aumentaba en los primeros 100 mseg posteriores a la liberación de speract, mientras que el aumento de calcio ocurría a los 200 mseg, lo que indica que el intercambiador sodio-protones (NHE) existente en la membrana del flagelo del espermatozoide juega un papel en el inicio de la vía, previo a la primera entrada de calcio a la célula. Datos nuevos obtenidos en el laboratorio del Dr. Darszon (Beltrán y Darszon, datos no publicados), de mediciones de pHi en célula única, muestran esta precedencia del pHi con mayor nitidez.

Un punto a recalcar sobre el NHE, es que se encuentra solamente en el espermatozoide, no en otras células [48]. La regulación rápida del pH intracelular debe tener un papel importante en la natación del esperma y, consecuentemente, en la fecundación.

Todo este conjunto de hechos abre la posibilidad de pensar en que en la red falta algún o algunos elementos para completar la vía de señalización. El hecho de que existe una alcalinización intracelular previa al aumento de calcio, sugiere que puede existir un elemento adicional que no se ha tomado en cuenta. Otra parte importante es que hay evidencia de que existen canales sensibles a ácido níflúmico que son activados por él (en esperma de mamífero). Tal es el caso del canal CatSper, un canal catiónico de calcio, sensible a pHi y a voltaje. Se ha demostrado que los ratones cuyos espermatozoides carecen de este canal son completamente estériles [2, 41]. Existe además dentro del genoma de *S. Purpuratus* la secuencia de este canal, es decir, la secuencia de nucleótidos necesarios para producir la proteína [49]. Sin embargo, aún no se ha encontrado el canal funcional en el espermatozoide. Por otra parte, se han generado anticuerpos específicos para la secuencia de CatSper en esperma de erizo de mar que indican su presencia en el flagelo (Datos no publicados). Por último, el análisis *in silico* del efecto de NFA, donde la activación del canal CaKC producía resultados distintos a las observaciones experimentales (descrito en el capítulo anterior), también ponen de manifiesto la necesidad de tomar en cuenta la participación de otros canales de calcio en esta vía de señalización.

Todos estas consideraciones refuerzan la idea de que debe haber un canal adicional en la vía de señalización y este canal debe ser sensible a pHi. El canal CatSper es un buen candidato, ya que cumple con las características

mencionadas y existe su secuencia en el genoma (Fig 19).

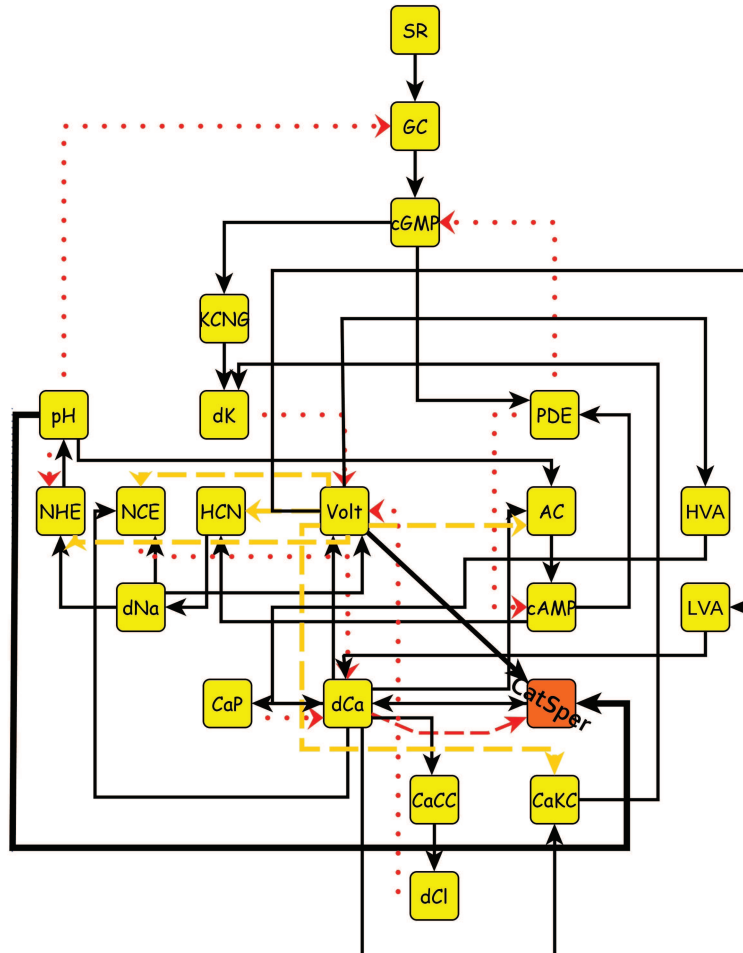


Figura 19. Red de señalización activada por speract en el flagelo de erizo de mar incluyendo al canal CatSper (anaranjado), así como sus regulaciones. El código de colores en los links es el mismo que en la figura 6. En esta figura no se diferencian los nodos ternarios.

5.1.1 Canal CatSper

El canal CatSper es un canal catiónico de calcio, activado por alcalinización y sensible al voltaje [2, 49, 41]. En mamíferos, la apertura de este canal en

el flagelo del espermatozoide permite el influjo de calcio, lo cual es necesario para procesos como la hiperactivación (un aumento grande en la motilidad) del esperma, así como la capacitación (fase final del desarrollo del espermatozoide donde adquiere la habilidad de fecundar al ovocito).

5.1.2 Tabla de verdad de CatSper

Tomando en cuenta todo lo anterior, introducimos el canal CatSper en nuestra red lógica, creando su tabla de verdad. Este canal es dependiente de pH_i , voltaje y se bloquea por calcio. Al aumentar el pH_i y no estar hiperpolarizada la célula, el canal CatSper se activaría, siempre que el calcio no estuviera en estado 2, es decir, durante su respuesta fásica, ya que el calcio bloquea al canal.

Como se mencionó líneas arriba, la tabla de catsper tiene 3 reguladores, pH_i , voltaje y calcio y, como también se dijo previamente, cada entrada de esta tabla, fue hecha tomando en cuenta los resultados experimentales obtenidos en experimentos en mamífero [2, 41].

$v(t)$	$pH(t)$	$Ca(t)$	<u>CatSper(t+1)</u>
0	0	0	0
0	0	1	0
0	0	2	0
0	1	0	0
0	1	1	0
0	1	2	0
1	0	0	0
1	0	1	0
1	0	2	0
1	1	0	1
1	1	1	1
1	1	2	0
2	0	0	0
2	0	1	0
2	0	2	0
2	1	0	1
2	1	1	1
2	1	2	0

5.2 Cambiando la regulación del calcio intracelular

El calcio ahora incluyendo al canal catsper, tendrá un canal adicional que lo lleve a su estado fásico (valor 2) además del canal LVA, el canal CatSper. Esto va a generar una dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ diferente a la que existía anteriormente.

5.2.1 Primera aproximación: todos los canales de calcio

Como primera aproximación, podemos asumir que todos los canales de calcio están presentes en el flagelo del espermatozoide y participan en la vía de señalización: los canales HVA y LVA, así como los canales CatSper. Haciendo esto, los resultados que obtenemos de la dinámica son los siguientes:

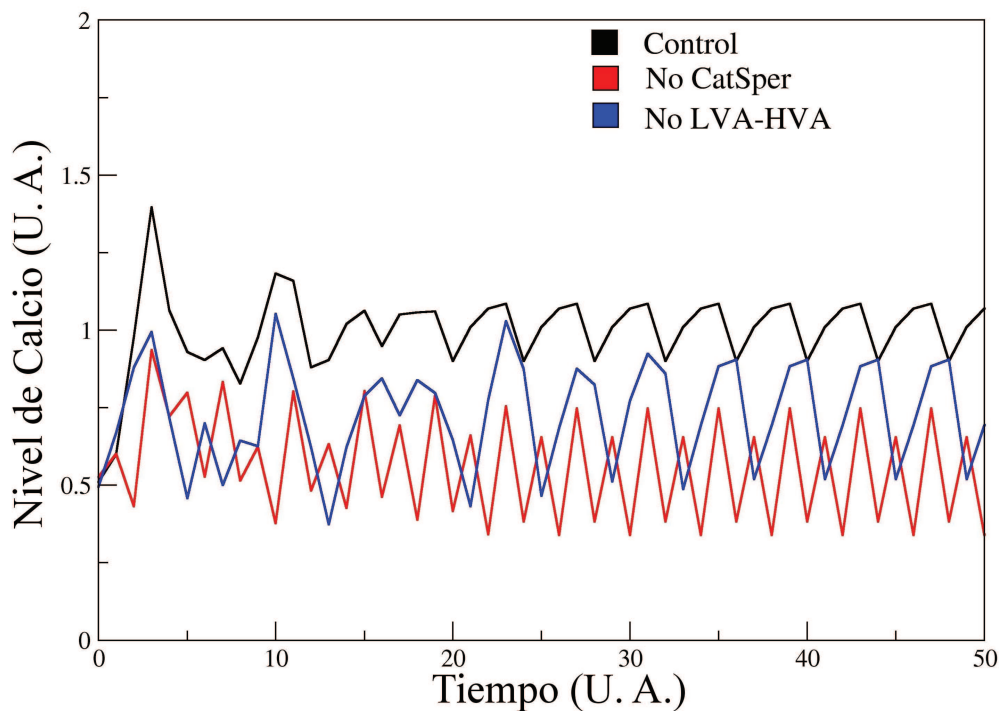


Figura 20. Resultados teóricos de simulaciones de la red bioquímica activada por speract adicionando el canal CatSper. A) Curvas de calcio WT (negro) y eliminando distintos nodos: CatSper (rojo) y LVA-HVA(azul).

Como puede verse en la figura anterior, pese a que al eliminar CatSper no desaparecen las oscilaciones de calcio, la concentración media es menor que en el caso WT e incluso es menor que al eliminar simultáneamente los canales LVA y

HVA. Este hecho resalta la preponderancia de CatSper en la vía de señalización, así como la presencia de mecanismos redundantes para subsanar alteraciones externas. Si bien es cierto que las concentraciones de calcio son menores en los casos tratados que en el WT, también es cierto que no desaparecen, al menos no por completo.

5.2.2 Sin canales HVA y LVA

Una de las razones por las que se especula sobre la existencia y participación de CatSper en la vía de señalización activada por speract en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar, es que, en mamíferos, es un canal importante en los procesos de hiperactivación y capacitación. Por otra parte, la regulación de pHi en el flagelo y la existencia de un intercambiador tan específico para el espermatozoide como el NHE, sugiere que la dinámica del pHi juega un papel fundamental en la motilidad y particularmente en la dinámica del $[Ca^{2+}]_i$. Si lo anterior es correcto, pudiera ser que el canal CatSper fuera el canal principal en la vía de señalización; los canales HVA y LVA serían accesorios y su participación secundaria o tal vez moduladora. La manera de sondear esta idea dentro de nuestro modelo lógico, es ver las consecuencias de eliminar los canales HVA y LVA de la red y hacer al canal CatSper el único elemento que ingrese calcio a la célula. Él sería el encargado de la respuesta fásica y el mantenimiento de la respuesta tónica se daría por la regulación entre la entrada de calcio por CatSper y los mecanismos salida de calcio: las bombas de calcio (CaP) y el intercambiador sodio-calcio (NCE).

Un elemento importante a tomarse en cuenta es que el canal CatSper presenta sensibilidad al ion magnesio $[Mg^{2+}]$.

5.2.2.1 Reconstruyendo la tabla del canal CaKC

La implementación de estos cambios produce una menor riqueza de comportamiento en la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$, por lo que las tablas regulatorias de los canales dependientes de calcio serán modificadas, ya que al ser estos canales los encargados de reiniciar la vía por medio de una hiperpolarización, se requiere activar fuertemente a los elementos que regulan. Tal es el caso del canal CaKC, que es permeable a potasio y que permite la salida de este ion, hiperpolarizando la membrana. Este canal depende de calcio y se abre a voltajes depolarizantes, es decir, en el lenguaje de nuestra red, el voltaje en valor 2 activa al canal CaKC, mientras que a valores de $v = 0$ y $v = 1$ son inhibidores.

En la tabla modificada, se le da menor importancia al voltaje en potencial de reposo ($v = 1$). De este modo, el canal se abrirá cada vez que haya calcio en estado 2 y no esté hiperpolarizada la membrana ($v = 0$), es decir, el voltaje en estado 0 es un inhibidor. La tabla de regulación del canal CaKC queda como sigue:

dCa(t)	v(t)	CaKC(t+1)
0	0	0
0	1	0
0	2	0
1	0	0
1	1	0
1	2	1
2	0	0
2	1	1
2	2	1

El renglón rojo indica el cambio. Antes, el 1 de la derecha era 0. Con esta modificación, se hizo evolucionar la dinámica para comparar con los resultados experimentales.

5.2.3 Bloqueos previos

Un aspecto fundamental para comprobar que un modelo es consistente, es observar que los resultados obtenidos previamente con dicho modelo, siguen presentes en el nuevo modelo. Se compararon todos los resultados previamente obtenidos sin CatSper (con HVA y LVA), con los obtenidos incluyendo este canal en la red (sin HVA y LVA). Se probaron eliminaciones como speract, potasio, fosfodiesterasas y el ion calcio mismo. Los resultados son consistentes con los previos. La figura 21 de las curvas de calcio lo muestra.

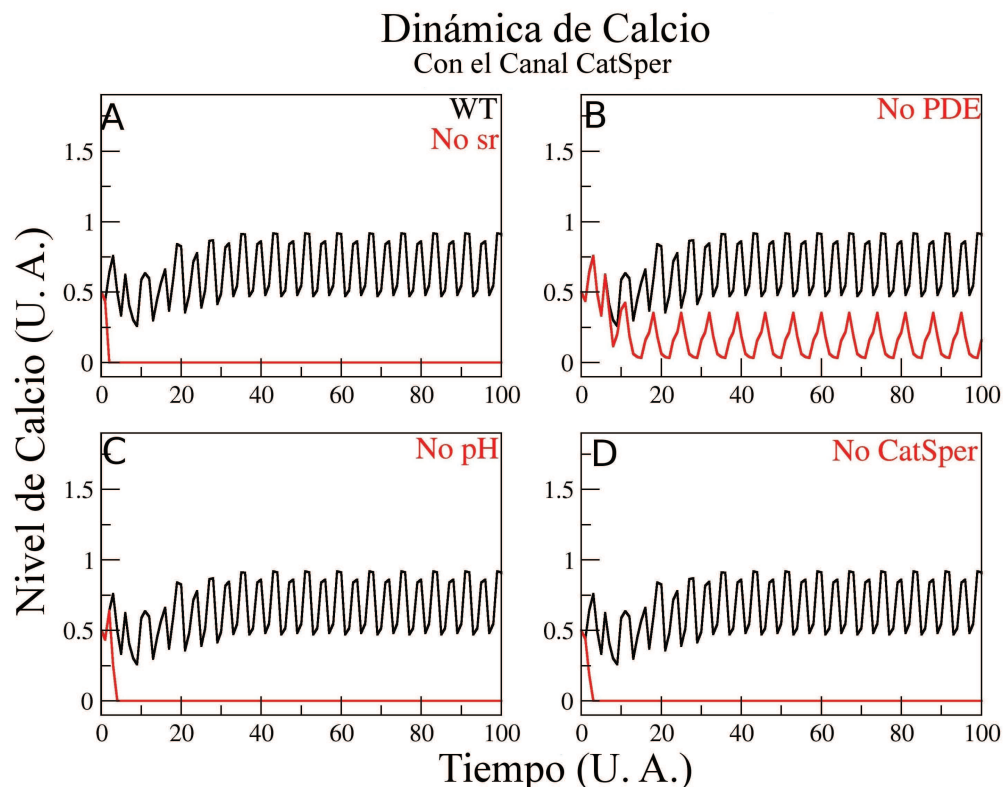


Figura 21. Curvas de calcio de la red sin canales HVA y LVA pero con el canal CatSper. En negro se observa la red con todos los nodos presentes y en rojo, la dinámica de la red sin un nodo en particular: A) sin receptor a speract. B) Sin fosodiesterasas. C) sin pH_i. D) sin canales CatSper. Nótese que los resultados son similares a los obtenidos con la red presentada en el capítulo 1.

5.2.4 Resultados de NFA

Como se expuso al final del capítulo III, se ha observado en diversos tipos celulares que el canal CaKC se activa con Acido Niflúmico (NFA); al hacer el experimento *in silico* de tratar con NFA la red, no se activó a este canal, sino que se bloqueó. Al activarlo, de acuerdo con [34], el resultado fue distinto al obtenido experimentalmente por [21]. Mientras que los picos y la media de calcio sí eran mayores, la periodicidad era menor.

Tomando esto en cuenta, ahora con las tablas incluyendo a los canales CatSper y sin la participación de los canales HVA y LVA, se hicieron las simu-

laciones de eliminar HCN y CaCC activando más el canal CaKC. Los resultados son los siguientes:

Calculos de Curvas de Calcio usando NFA sin Activar CatSper

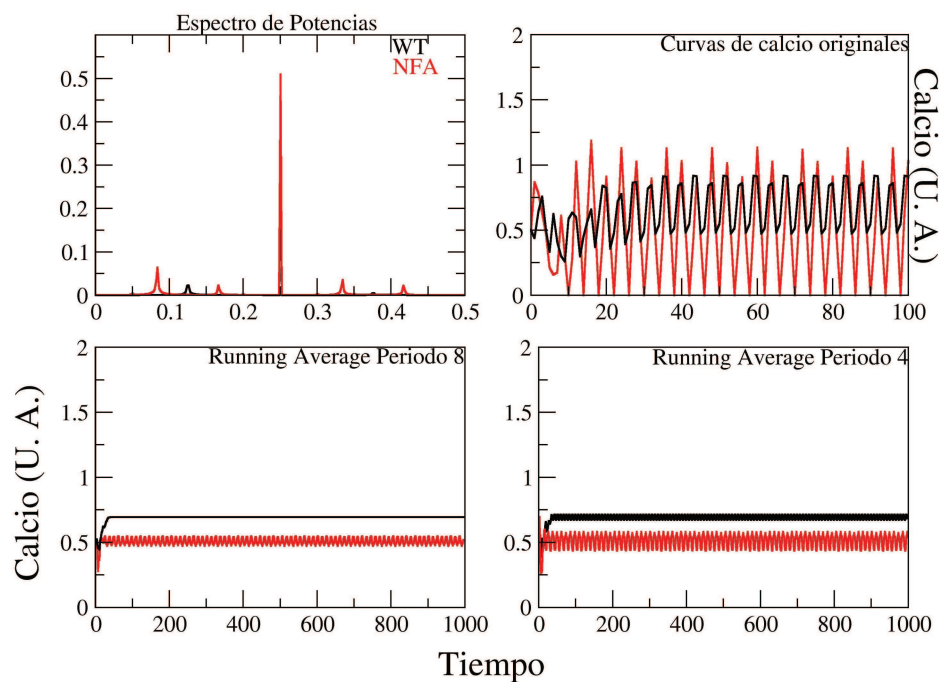


Figura 22. Cálculos hechos para la red bloqueando los canales sensibles a NFA (HCN y CaCC) y activando los canales CaKC. Estos resultados se obtienen incluyendo al canal CatSper y sin canales HVA y LVA A) Espectro de potencias del estado estacionario de las curvas de calcio con todos los nodos presentes (negro) y para la red afectada por NFA (rojo). Se puede observar un mayor número de componentes de Fourier en la curva roja, indicativo de una curva de calcio con periodo mayor. B) Curvas de calcio para la red WT y la red tratada con NFA. C) y D) Curvas de calcio de B) promediando sobre una ventana de periodo 8 y periodo 4, respectivamente. El código de colores es el mismo que en A), así como en C) y D). Es posible observar claramente en C) y en D) que la concentración media de calcio es menor en el caso con NFA que en el WT.

Como puede observarse en la figura, pese a que hay picos mayores de calcio y la amplitud de la curva es mayor en el caso tratado con NFA, la concentración media es menor que en el caso WT, esto se vuelve más aparente en las figuras C y D, donde se hace una atenuación de la amplitud de las curvas promediando ventanas de tamaño 8 y 4, respectivamente. Por otro lado, el espectro de Fourier muestra un mayor número de componentes que en el caso de NFA. Con esta

figura, se pone de manifiesto que dos de los resultados son consistentes con los experimentos (amplitud de la curva de calcio y pico máximo mayores en la red tratada), y dos son opuestos (media de calcio y periodos menores en la red tratada). Por lo tanto, podemos concluir de estos últimos resultados que la presencia de CatSper no es una condición suficiente para recuperar todas las observaciones experimentales.

5.2.5 NFA activa a CatSper

También se ha observado que NFA activa (tal vez de manera indirecta) la corriente de calcio inducida por CatSper en mamífero. Por lo tanto, incluimos la dependencia de NFA en CatSper, de modo que el papel de NFA no sólo sería el de activar a CaKC sino también a este otro canal. En ambos casos activar a los canales, en el contexto del modelo, implica dejar en el estado 1 un determinado tiempo a los canales, independientemente del estado de sus reguladores. Para ambos casos, se probaron distintos tiempos de activación, desde dejarlos prendidos durante toda la dinámica, hasta activarlos uno de cada 4 pasos. Los resultados varían muy poco entre ellos. La figura 23 muestra a los canales CatSper y CaKC activos durante 3 de cada 4 pasos de tiempo.

En este caso, la concentración media, los picos máximos, la periodicidad y la amplitud son visiblemente mayores en el caso con NFA que en el WT.

Con este resultado, por primera vez se tiene una explicación coherente de cómo actúa el ácido niflúmico en la vía de señalización activada por speract en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar a nivel de canales individuales y a nivel colectivo. Se observó el efecto particular que tiene sobre distintos canales iónicos, tales como los canales HCN, CaCC, que son inhibidos por NFA y los canales CaKC y CatSper que son activados por este fármaco.

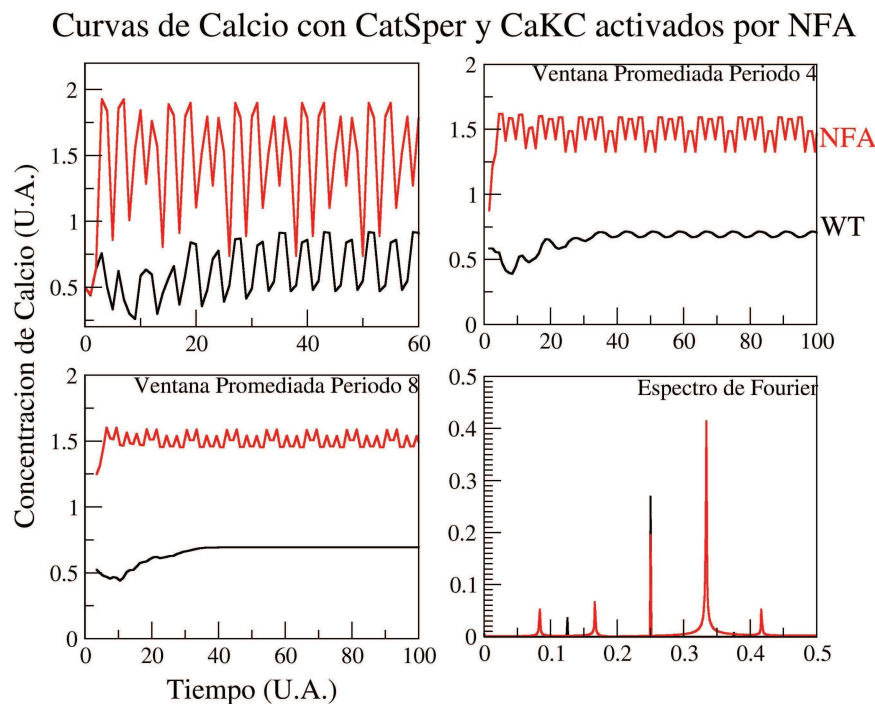


Figura 23. Dinámica del calcio en la red con todos los nodos presentes (negro) y la red tratada con NFA (rojo). En este caso, se bloquearon los canales HCN y CaCCy se activaron los canales CatSper y CaKC. A) curva normal de calcio. B) y C) Curvas de calcio con ventanas promediadas de periodo 4 y 8 respectivamente. Aquí se observa cómo desaparece las fluctuaciones de calcio en la curva WT mientras que en la tratada con NFA hay una periodicidad que se mantiene. D) Espectro de potencias. Es posible observar un mayor número de componentes de Fourier, que en este contexto, se traduce como una mayor riqueza temporal de la curva tratada con NFA.

5.3 El caso de iberiotoxina

En el capítulo 2 se predijo la existencia y participación del canal de potasio dependiente de calcio CaKC. El eliminarlo de la red producía (en el modelo), un aumento en la periodicidad del atractor, así como un aumento en la concentración media de calcio. Al hacer el experimento in vivo, los espermatozoides expuestos a iberiotoxina, (un bloqueador específico de los canales CaKC), sufrían un incremento en el tiempo entre oscilaciones de calcio, sin embargo, la concentración media de calcio era menor que en el caso WT. Este resultado provocó que se generaran varias hipótesis sobre la vía de señalización y el papel

de los canales de potasio. Una de las hipótesis era que la iberiotoxina tuviera un blanco menos específico, por ejemplo el canal KCNG; este canal es sensible a moléculas intracelulares (cGMP), así como el canal CaKC es sensible al calcio intracelular. Probablemente la iberiotoxina se uniría de manera menos específica al canal KCNG. Otra hipótesis era que el canal CaKC tuviera una actividad basal en ausencia de speract. Lo cual provocaría que los espermatozoides cargados previamente con iberiotoxina tuvieran una depolarización previa a la activación de la vía con speract. Esta depolarización no permitiría que la vía tuviera una primera hiperpolarización fuerte, lo que a su vez, generaría una actividad menor de todos los componentes de la red.

Al modelar las curvas de calcio utilizando la red con CatSper y eliminando el canal CaKC, el resultado que se obtiene es consistente con el efecto que tuvo Iberiotoxina en el flagelo del espermatozoide, el aumento de la periodicidad y el decremento de la concentración media de calcio. El modelo, que en un principio no incluía a CatSper, fue construido con base en la literatura conocida hasta ese momento sobre de la vía de señalización. La incorporación de CatSper a la red, reforzó una propuesta hecha con anterioridad [6], dando confiabilidad a la red y apoyando la existencia y participación de CatSper en la vía de señalización activada por speract.

El resultado aquí mostrado, es importante por la forma en que se obtuvo. Se había predicho la participación del canal CaKC en la vía de señalización. Nuestros primeros resultados fueron parcialmente consistentes con los experimentos. Con la inclusión del canal CatSper en nuestra red pudimos recuperar las predicciones hechas con anterioridad, sin perder las ya existentes.

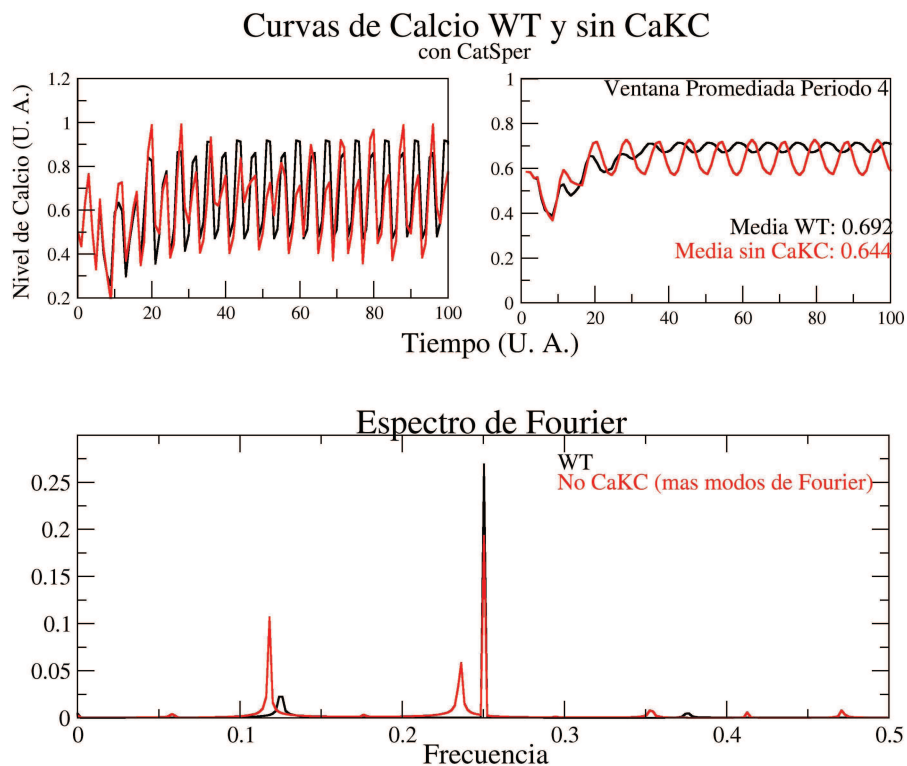


Figura 24. Efecto de eliminar el canal CaKC de la red para simular el uso de iberiotoxina en el espermatozoide de erizo de mar. A) Dinámica de calcio con todos los nodos presentes (negro) y sin CaKC (rojo). Nótese que existe una envolvente en la curva roja, indicativo de una periodicidad de tiempos más largos. Por otro lado, la media de calcio resulta ser menor que en el WT, situación que fue observada experimentalmente usando iberiotoxina. B) Espectro de potencias. De nuevo nótese los picos rojos que son más que los picos negros, es decir, los componentes de Fourier en el caso sin CaKC son más que en el WT, que indica la presencia de oscilaciones con periodo mayor en el caso de la serie sin CaKC.

5.4 Robustez

La robustez se entiende como la capacidad que presenta una red para mantenerse estable ante perturbaciones, sin alterar de manera considerable su dinámica o estructura, es decir, qué tan fuerte es la red ante cambios; es la invarianza de fenotipos ante perturbaciones [50, 51, 52]. El concepto de robustez implica que una red tiene la capacidad de enfrentar variaciones externas de manera que no repercuta en su funcionamiento. Esto le confiere la cualidad de que alteraciones

pequeñas pueden ser asimiladas, adquiriendo propiedades nuevas sin perder las anteriores. Por lo tanto, la robustez puede ser considerada como un elemento clave en los sistemas biológicos [53, 54, 55, 56, 51, 52]. Es una característica fundamental en sistemas de nivel superior que no puede entenderse al mirar los componentes individuales. Un sistema debe ser robusto para funcionar en ambientes con variaciones impredecibles de manera fiable.

Robustez contra perturbaciones del medio ambiente y robustez genética son esenciales para la capacidad de evolucionar [55, 56]. Un rasgo de la robustez genética, es que el organismo puede generar una gran variedad de fenotipos no letales, así como tener un reservorio genético capaz de responder ante eventualidades. Las redes bioquímicas deben ser capaces de responder a los diferentes entornos haciendo uso de sus componentes básicos. Durante la evolución de la vida, los sistemas han adquirido características y componentes que en algunas condiciones no tienen funcionalidad; sin embargo, en virtud de cambios ambientales, los componentes que antes no eran útiles, adquieren funcionalidad y pueden permitir la adaptación al nuevo entorno.

Para la red de señalización activada por speract, es importante tener alguna medida de robustez o de estabilidad estructural, es decir, que la red ante pequeños cambios en su estructura, no altere la dinámica de manera importante. Una manera de investigar si la red de señalización que hemos construido presenta esta cualidad es generar cambios pequeños en la evolución de esta red, modificando una entrada de las tablas de verdad, es decir, si el estado de un nodo al tiempo $(t+1)$ es 0, cambiarlo por un 1 y viceversa (Tabla inferior). Hacer esto sistemáticamente y ver cómo cambia el paisaje de atractores, ya que el paisaje de atractores da una idea del comportamiento que presenta una red a largo plazo.

$AC(t)$	$PDE(t)$	$cAMP(t)$	$cAMP(t+1)$
0	0	0	$0 \rightarrow \mathbf{1}$
0	0	1	1
0	1	0	0
0	1	1	0
1	0	0	1
1	0	1	1
1	1	0	0
1	1	1	0

La figura siguiente es un histograma de frecuencia de apariciones de una configuración de la red una vez que ha llegado al atractor. Al “mutar” una red, es decir, al cambiar una entrada de la tabla de verdad de un nodo de la red, se itera la dinámica hasta que se llega al estado estacionario. En este caso, los atractores que se obtienen son prácticamente los iniciales, salvo en un porcentaje muy bajo en el que se obtienen atractores diferentes. Es importante señalar que los atractores nuevos que se obtienen son de periodos múltiplos de 4 en todos los casos, es decir, en al menos uno de los atractores de las condiciones que llevan a atractores nuevos, hay un atractor de periodo 4 o múltiplo de 4.

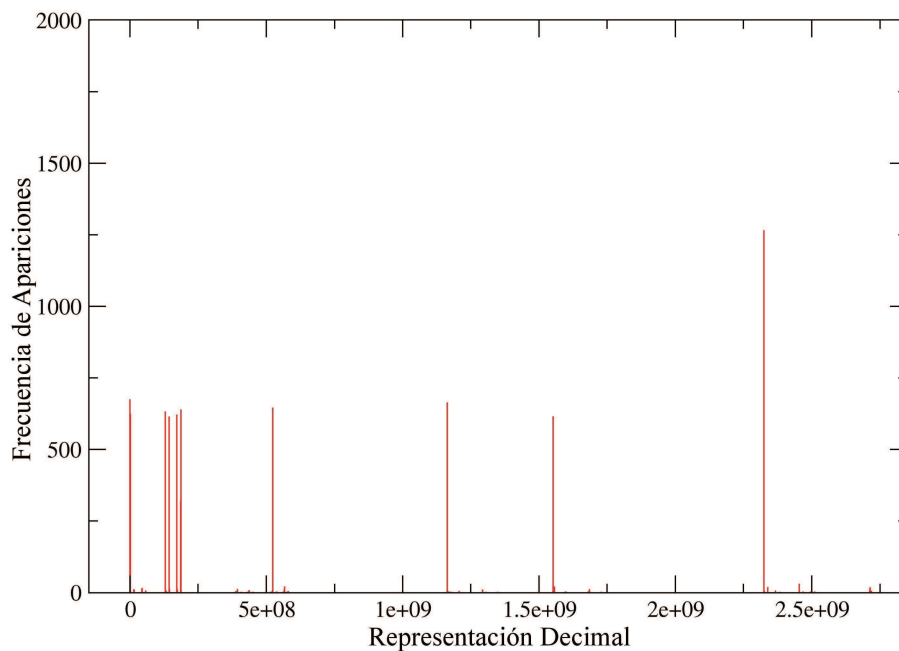


Figura 25. Frecuencia de aparición de una configuración (estado dinámico) del atractor después de un cambio en una función reguladora. Cualquier condición inicial de la red alcanza un atractor, este atractor tiene diferentes estados dinámicos (una secuencia de 0, de 1 o de 2); cada estado puede ser entendido como una cadena de números en base 3. Por lo tanto, esta cadena se puede convertir en su representación decimal. Se calculan todas las condiciones iniciales que forman el paisaje de atractores (todos los atractores, cada uno de ellos con su cuenca de atracción y con su respectivo número de estados dinámicos, que corresponden al periodo del atractor). Cambiando una función reguladora, como en la tabla anterior, podemos obtener un nuevo paisaje de atractores, que puede ser similar o diferente al original. Después de cambiar todas las funciones de regulación posibles (en este caso, 616), se obtuvieron 3,184 estados dinámicos diferentes. Esta figura muestra que hay un pequeño número de estados dinámicos que aparece mucho más frecuentemente que el resto de los estados. La línea más grande de la derecha guarda dos estados dinámicos muy juntos, por lo que el número de bins que se usó para obtener esta figura es menor del que se necesita para separar cada estado. Las líneas rojas son 12, la resolución no permite distinguirlas. Las doce líneas corresponden a los 4 estados del periodo 4 y los 8 estados del atractor de periodo 8 del WT. El número tan bajo de líneas verticales demuestra que, en virtud ligeros cambios en la estructura de la red, ésta sigue siendo robusta.

Una vez dentro del estado estacionario, o dicho de otra manera, una vez dentro del atractor, cada estado dinámico de ese atractor (si el atractor es de periodo 4, el atractor tendrá 4 estados dinámicos), constituido por una secuencia de unos y ceros, se convierte en su representación decimal, de modo que, por ejemplo, la secuencia:

1 0 0 0 1 0 0 1 0

se convierte, en su representación decimal en el número 274.

Una vez convertida a su representación decimal cada una de las configuraciones de todos los atractores obtenidos de “mutar” las redes, se contó las veces que apareció cada una de estas secuencias. Las líneas rojas verticales indican qué tantas veces apareció determinado estado de configuraciones de la red después de cambiar una función reguladora de las tablas. Como es posible ver, hay muy pocas líneas, lo que indica que en la gran mayoría de las veces, para ser más precisos, en el 95 % de los casos, los atractores a los que se llegaba al mutar las redes, era el mismo que en el caso WT, sin embargo, sí hubo ocasiones en las que se cambiaron los atractores. Este es un buen indicativo de lo que previamente se había comentado sobre la criticalidad de nuestra red. La red tiene la propiedad de ser resistente a pequeñas perturbaciones en la gran mayoría de las situaciones, sin embargo, hay cambios que la pueden hacer llegar a atractores diferentes. Esto le puede conferir a la red la capacidad de

evolucionar, dado que soporta perturbaciones y a su vez, es flexible ante otros cambios.

5.5 Redundancia en redes bioquímicas

Mecanismos que alcanzan robustez frente a perturbaciones ambientales también pueden ser utilizados para la consecución de robustez contra las mutaciones, la estabilidad durante el desarrollo y otras características que facilitan la cualidad de evolucionar [53, 55, 56, 54]. A veces, la robustez es indicativo de la existencia de alteraciones neutras en la estructura o en la dinámica del sistema[55], de modo que debe haber redundancias funcionales o degeneraciones, esto es, un exceso de elementos que realizan la misma o casi la misma función dentro de la red. Esta redundancia puede ser importante para modular comportamientos dentro de ambientes diferentes. Esto se discutirá en capítulos posteriores, sin embargo, un análisis de la redundancia existente en nuestra red, puede ser importante para conocer los elementos mínimos del sistema para generar las respuestas oscilatorias de calcio que se observan en los espermatozoides de erizo de mar al adicionar moléculas activadoras del esperma. En las páginas siguientes se analizarán diferentes criterios para reducir redes, basados en características obtenidas a partir de la dinámica de nuestra red.

5.5.1 Análisis de redundancia en la red de señalización activada por speract en el espermatozoide de erizo de mar

5.5.1.1 Curvas de $[Ca^{2+}]_i$

Un método empírico y más bien subjetivo, pero que nos da una idea de cómo pueden observarse los nodos redundantes en nuestra red, es generar curvas de calcio con un nodo eliminado y ver el parecido que tienen las curvas entre ellas. Agrupar los conjuntos de curvas con dinámicas similares y tratar de establecer grupos o módulos.

Para obtener las curvas de calcio, se promedió la dinámica de 100 000 condiciones iniciales con todos los nodos presentes y eliminando un nodo de la red. Después de eliminar cada uno de los nodos de la red, se obtuvieron 4 comportamientos cualitativamente distintos; se pudo agrupar estos 4 comportamientos principales y se observaron los nodos que pertenecían a cada grupo:

- Curvas muy similares a la red con todos los nodos presentes (WT).
- Curvas que llevaban todo a cero.
- Curvas de $[Ca^{2+}]_i$ con una concentración menor al WT.
- Curvas con una periodicidad muy diferente al WT aunque con una media de $[Ca^{2+}]_i$ muy similar a la curva control.

Curvas de Calcio con Nodos Eliminados

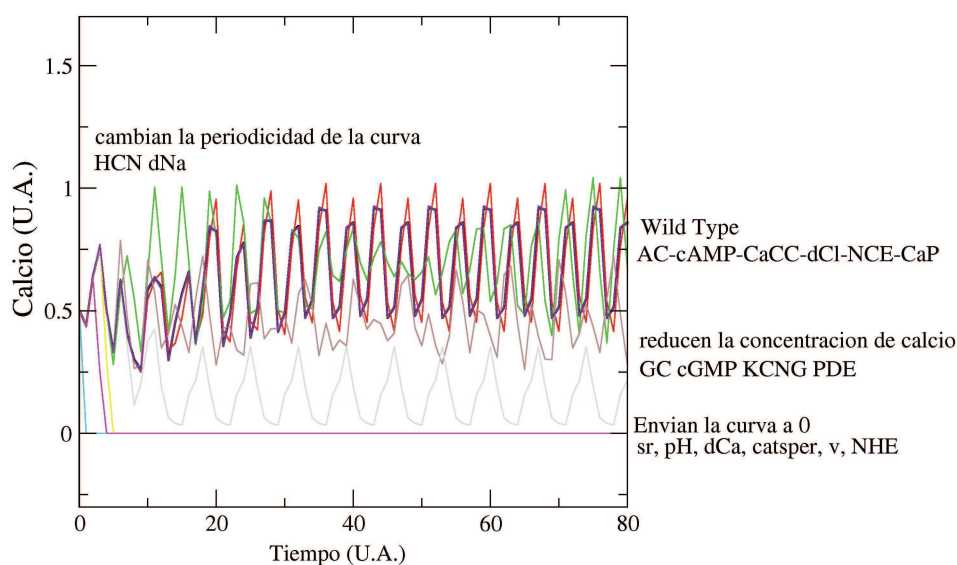


Figura 26. Curvas de calcio con todos los nodos presentes y un nodo eliminado. Es posible observar que hay varias líneas que se traslapan con la curva WT (negra). Esas curvas, al eliminar los nodos, no afectan la dinámica, en cambio otras, al ser eliminados los nodos correspondientes, cambian el patrón dinámico del calcio. Varias eliminaciones mandan el calcio a cero, otras bajan su concentración y otras cambian la periodicidad sin alterar su valor medio.

5.5.1.2 Atractores

Otra forma de reducir la red, menos subjetiva, es agrupar los nodos por la forma de su paisaje de atractores, es decir, tras eliminar un nodo, observar su cuenca de atracción, el periodo y el estado de la red. Si el paisaje de atractores que se genera en la red al eliminar dos nodos cualesquiera, es similar entre ellos, esos dos nodos los agrupamos. De esta forma, generamos grupos de nodos que al ser eliminados producen un estado estacionario similar.

Los atractores fueron obtenidos de 10^6 condiciones iniciales distintas. La red WT, con todos los nodos presentes, generó 2 atractores, uno de periodo 4 y otro de periodo 8. Al eliminar un nodo, se pudieron agrupar los atractores en 4 grupos principales:

- a) Los que llevan a un atractor puntual, donde casi todos los estados son cero.
- b) Los que permanecen igual que el WT.
- c) Aumentan los atractores y los periodos.
- d) Conserva el número de atractores pero cambia el estado de la red.

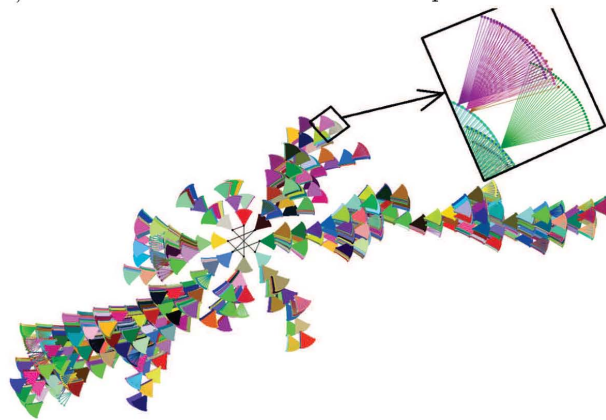


Figura 27. Representación gráfica de un paisaje de atractores. La inserción de la parte superior derecha muestra la estructura en forma de abanico donde cada punto representa un estado dinámico de la red, y las líneas representan pasos de tiempo discretos. Los dos puntos están conectados si uno es el sucesor de el otro dentro de la dinámica. Estas estructuras, representan un conjunto de diferentes estados dinámicos que convergen a un sólo estado. Todas las estructuras, finalmente convergen hacia el atractor, que es representado por los puntos negros conectados en el centro de la imagen.

Los módulos obtenidos a partir del paisaje de atractores después de eliminar un nodo de la red son los siguientes: sr; pHi-NHE; HCN-dNa; catsper; GC-cGMP-KCNG; CaKC; dK; v; dCa; AC-cAMP-CaCC-dCl-NCE-CaP (estos son prácticamente iguales al WT, salvo el nodo que se elimina en cada caso) y finalmente el nodo correspondiente a las fosfodiesterasas, PDE.

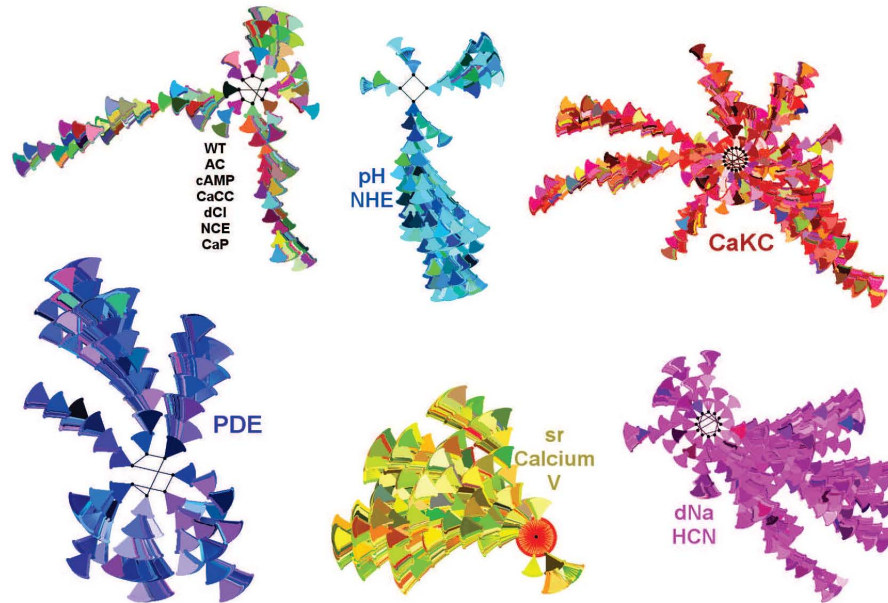


Figura 28. Representación gráfica del paisaje de atractores al eliminar un nodo de la red. Cada estructura representa el paisaje de atractores generado por la dinámica de la red de señalización al eliminar un nodo. Si la eliminación de dos nodos por separado genera el mismo paisaje de atractores (no solamente el mismo paisaje, también la misma cuenca, salvo el nodo eliminado), los nodos se agrupan. La figura de arriba a la izquierda muestra el paisaje generado por la dinámica con todos los nodos presentes (WT) y aquella generada al eliminar los nodos AC, cAMP, CaCC, dCl, NCE, CaP. Las demás estructuras muestran el paisaje de atractores señalando el nodo que fue eliminado.

5.5.1.3 Mapeo de Derrida

Al incorporar CarSper en la red, la estructura de ésta cambió. Para observar si se conservaban sus propiedades dinámicas, se realizó de nuevo el mapeo de Derrida, obteniéndose una red con un régimen dinámico crítico, mostrando que la red modificada conserva esta característica (criticalidad). La criticalidad es una propiedad que se conserva dentro de la red porque la inclusión de CatSper en la red lo conecta altamente con el resto de la red vía el ion calcio. Insertar un nodo con conexiones al azar no genera siempre una red crítica. También se hizo el mapeo de Derrida modificado, explicado en el capítulo anterior, para observar qué elementos de la red, al ser eliminados, generaban una dinámica caótica. Los nodos que al ser eliminados dan lugar a una dinámica caótica son:

v, dCa, sr, pHi, HCN, cGMP, dK, PDE, NHE

Se presume que estos nodos son relevantes al sistema, eliminaciones o bloqueo de cualquiera de ellos repercute en la dinámica del calcio.

Mapeo de Derrida Modificado

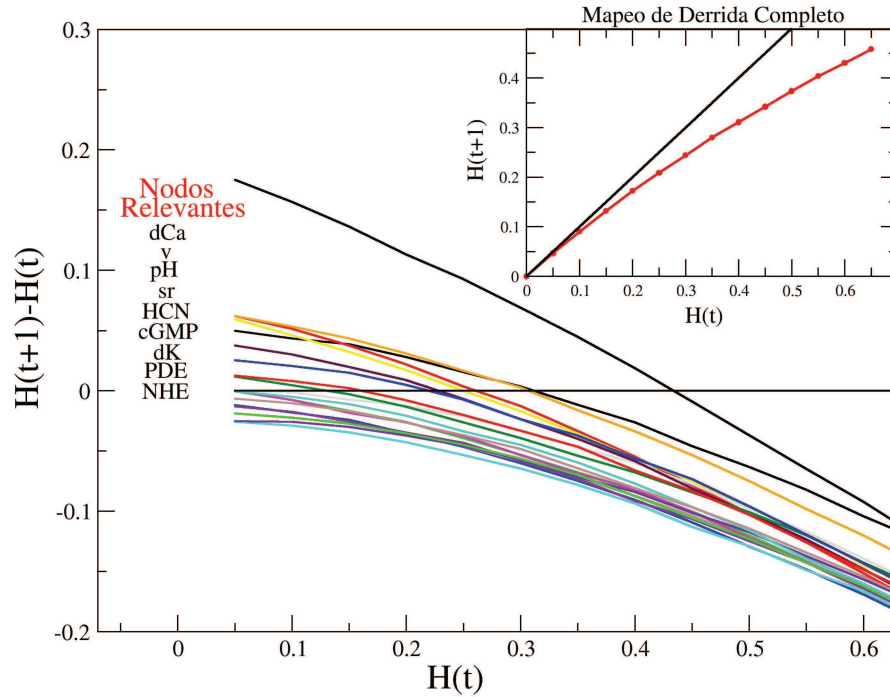


Figura 29. Mapeo de Derrida modificado mostrando los nodos que resultaron generar dinámicas caóticas al ser eliminados. El inserto es el mapeo de Derrida original, mostrando que la pendiente al llegar al origen es prácticamente 1.

5.5.1.4 Correlaciones entre las curvas de calcio

Finalmente, otra forma de evaluar el efecto de eliminar un nodo de la red es el índice de correlación entre series de tiempo, es decir, qué tan relacionadas están dos mediciones a lo largo del tiempo. La manera más usual para establecer este tipo de relaciones es el índice de correlación de Pearson $\rho_{x,y}$, que es una medida de la dependencia entre dos variables aleatorias X y Y. El índice de correlación de Pearson se calcula de la manera siguiente:

$$\rho_{x,y} = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \sigma_y} = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \mu_x)(y_i - \mu_y)]}{\sigma_x \sigma_y}$$

donde σ_{xy} es la covarianza de (x, y) ; σ_x y σ_y son las desviaciones típicas de las variables x y y , respectivamente. Finalmente, μ_x y μ_y son el promedio de las variables x y y .

La forma en que se hicieron las correlaciones entre las curvas de calcio fue:

- Evolucionar la red durante mil pasos. Promediar 100 000 condiciones iniciales aleatorias y generar las curvas de calcio promediadas.
- Cortar los primeros 200 pasos para asegurarnos que la curva está en el estado estacionario. Eliminar cada uno de los nodos de la red y repetir los primeros pasos.
- Obtener el índice de correlación de Pearson entre cada par de curvas, es decir, la curva WT contra la curva sin speract, la curva sin speract con la curva sin GC, etc, y así sucesivamente hasta correlacionar todos los pares de curvas.

La obtención de este índice nos permite establecer una estructura modular de la red basados en lo siguiente: la eliminación de un nodo genera una dinámica del calcio similar a la eliminación de otro. Es decir, si la eliminación de dos nodos produce curvas de calcio con correlaciones muy altas, es indicativo que dichos nodos pertenecen a un mismo módulo funcional. La red de correlaciones muestra los nodos entre los cuales la correlación fue mayor a 0.95. Lo importante de estas correlaciones es que solamente están entre grupos bien definidos:

- sr, pHi, dCa, CatSper y v presentan correlaciones altas al hacer que la curva de calcio se haga cero.
- NHE wt CaP NCE cAMP dCl CaCC AC están altamente correlacionados entre ellos.
- CaKC está correlacionado con el wt pero con un valor más bajo que los nodos mencionados anteriormente ($\rho_{CaKC,WT} = 0.85$).
- GC, cGMP y KCNG están correlacionados entre ellos.
- HCN y dNa están correlacionados entre ellos.
- PDE no presenta correlación con ningún otro elemento.

Con estos tres métodos (reducción por atractores similares, por el mapeo de Derrida y por correlaciones entre curvas de calcio), es posible reducir el número

de elementos pertenecientes al sistema, con la finalidad de generar una red mínima que conserve las características esenciales de la original. A continuación se presenta una tabla que resume los nodos que se consideran relevantes para cada uno de los métodos de reducción.

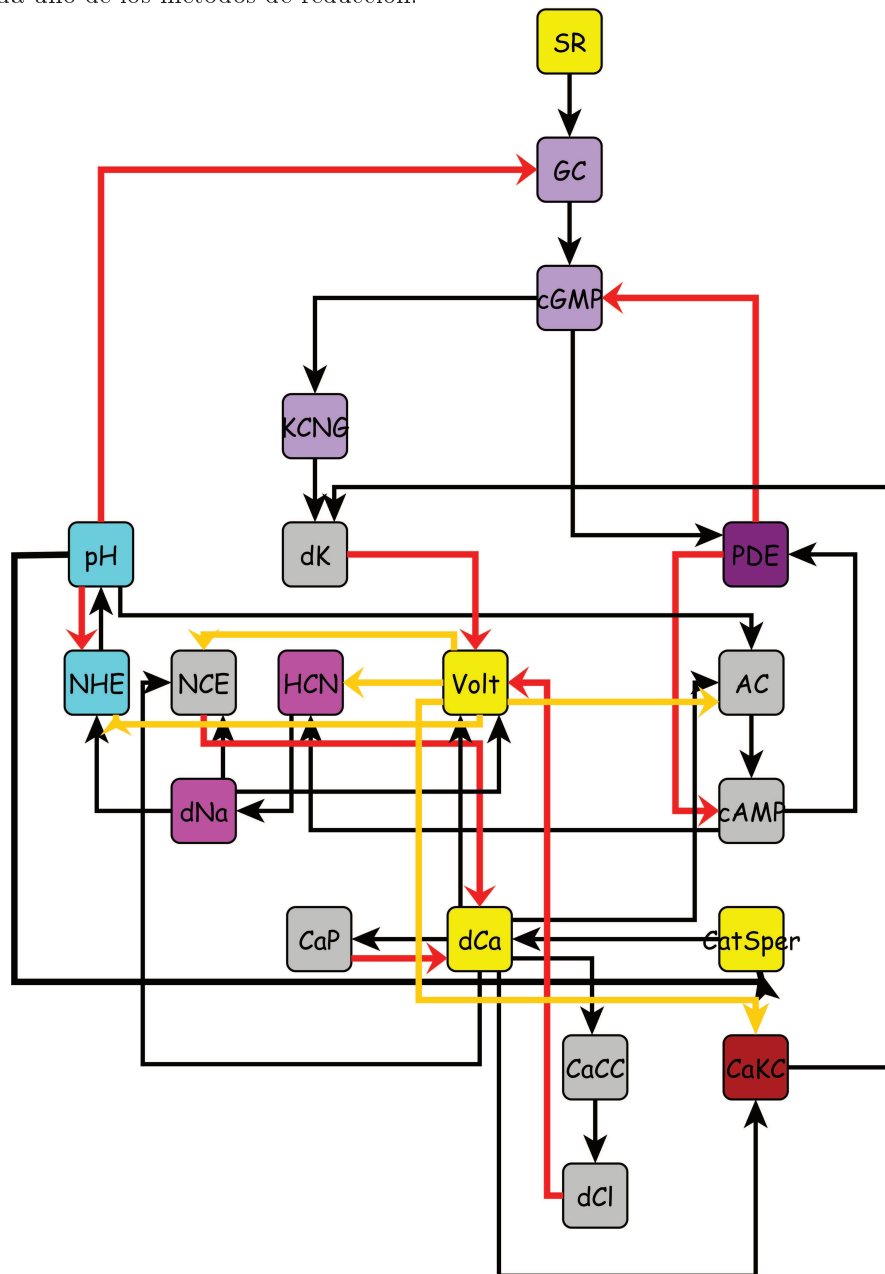


Figura 30. Red de de señalización activada por speract mostrando nodos con correlaciones altas en las curvas de calcio al ser eliminados.

Tabla 3. Elementos relevantes que permanecen en la red después de la reducción por los tres criterios: Correlaciones altas entre nodos, paisaje de atractores similares y mapeo de Derrida modificado.

Correlacion	Atractores	Derrida Modificado
sr	sr	sr
dCa	dCa	dCa
y	y	y
PDE	PDE	PDE
pH	pH-NHE	pH
HCN-dNa	HCN-dNa	HCN
cGMP-GC-KCNG	GC-cGMP-KCNG	cGMP
NHE	dK	dK
CaKC	CaKC	NHE
Catsper	Catsper	
WT-like	WT-like	

El modo en el que se obtuvo la red mínima a partir de estos métodos fue tomar como un nodo válido aquél que apareciera como relevante en al menos dos de los tres métodos. Para decidir si un nodo es relevante dentro del método de correlación (ya que dentro de un módulo funcional todos tienen por principio la misma relevancia), nos basamos en los resultados obtenidos por los otros dos métodos. Por ejemplo, el módulo GC-cGMP-KCNG tiene un componente en el mapeo de Derrida, que es el cGMP. Por lo tanto, el cGMP se considera el nodo relevante de dicho módulo. De este modo, la red reducida queda como en la figura 31.

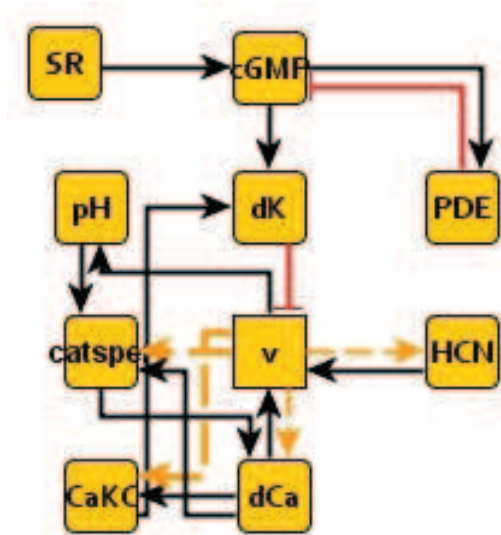


Figura 31. Red reducida obtenida por la integración de tres métodos distintos: correlaciones entre series de calcio, atractores similares y la modificación del mapeo de Derrida. De este modo, la red pasa de tener 22 elementos a tener solamente 10. El código de colores de las conexiones es el mismo que en redes anteriores.

Con estas reconexiones, se crearon las tablas de verdad, también basadas en las tablas previas, si algún nodo intermedio estaba ausente por resultar no relevante, se continuaba la conexión. Por ejemplo, si el nodo A es input del nodo B y éste a su vez es input del nodo C, si el nodo B desaparece, el nodo A se conecta al nodo C de forma directa, conservando la misma regulación que se tenía previamente entre B y C.

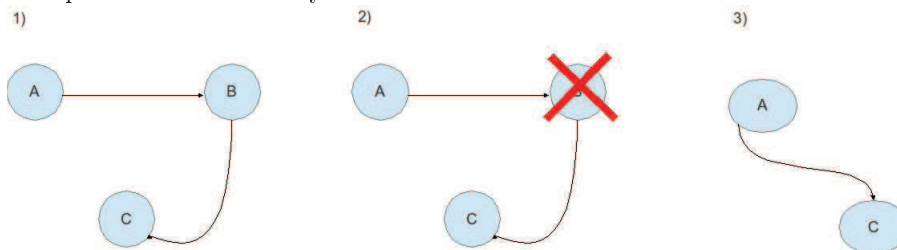


Figura 32. Representación de la eliminación de un nodo en la red y su consecuencia en la regulación. 1) Red con 3 nodos donde A está conectado a B y éste conectado a C. 2) eliminación de B. 3) Reconexión de A a C.

Finalmente, se generó la dinámica de calcio, el mapeo de Derrida y se cal-

cularon los atractores. El mapeo de Derrida se muestra a continuación:

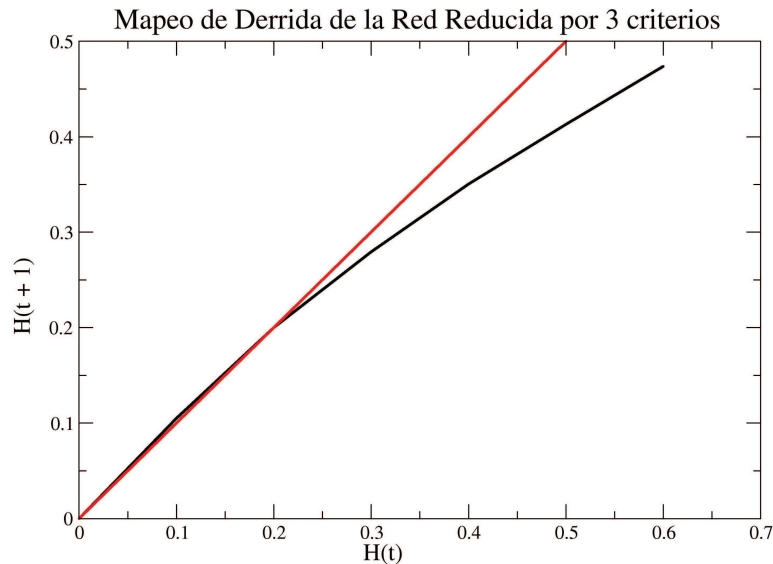


Figura 33. Mapeo de Derrida para la red reducida. Nótese que también es crítica la Red. La pendiente en el origen es 1.05.

Como se puede apreciar, la figura 33 presenta la propiedad de criticalidad. En cuanto a los atractores, éstos presentan oscilaciones en el nodo correspondiente al calcio. Tenemos uno de periodo 8 y uno de periodo 24.

5.6 Experimento y Modelo

Al incluir CatSper en nuestra red y usar este nuevo elemento para obtener la dinámica del calcio y encontrar concordancia con experimentos (figura 34), es un hecho para remarcar. La red, comportándose como un sistema en el cual sus propiedades globales (como robustez, criticalidad, modularidad o redundancia) emergen a partir de propiedades individuales, es un ejemplo más de la importancia de utilizar un enfoque de Biología de Sistemas para entender mejor las interacciones que existen en los seres vivos.

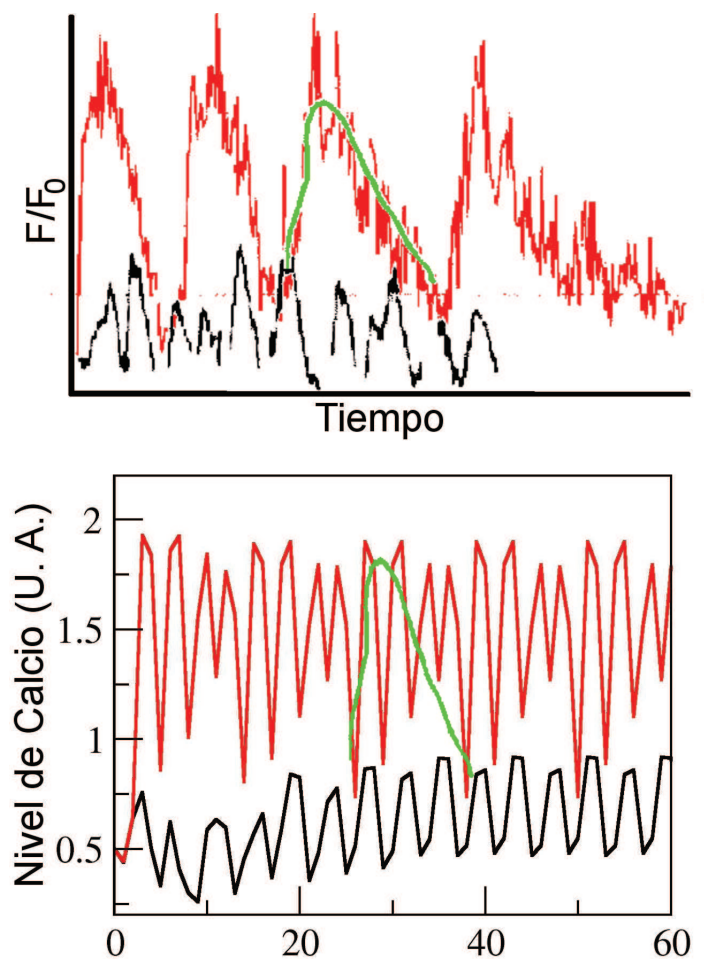


Figura 34. Dinámica de calcio posterior a la adición de speract al utilizar Ácido Niflúmico. Comparación de experimento y modelo. En ambos casos la línea negra representa la serie WT y la línea roja representa la serie tratada con NFA. Figura superior: experimento en célula única adicionando 100nM de speract (negro) y 100nM de speract más 10 μ M de NFA (rojo) (modificado de [22]). Figura inferior: Dinámica de calcio bloqueando los canales sensibles a NFA (HCN y CaCC) y activando CatSper y CaKC. La línea verde es una superposición de la tendencia que muestra la dinámica de calcio en ambas series.

Capítulo 6

Redes acopladas en el espacio

En este capítulo, que es parte de un trabajo en proceso, veremos que probablemente la red no sólo depende del tiempo, sino también del espacio; que existe una manera en la que el espermatozoide puede distinguir señales externas dependiendo de la distribución de sus componentes en el espacio del flagelo. Entenderemos cómo el tiempo transitorio se relaciona con la sincronización de islotes de señalización. Explicaremos cómo se hace el modelo extendido y su importancia e implicaciones en este contexto, se expondrá el hecho de encontrar transiciones discontinuas entre diferentes valores de acoplamiento. Expondremos la idea de hacer al flagelo un sistema isopotencial debido a su parecido con una neurona. Trataremos de ligar los resultados del modelo extendido a una posible explicación del hecho que un espermatozoide presente quimiotaxis y otro no. Todos estos resultados están en fase de revisión, sin embargo aquí se muestran para dar una idea de la dirección de la investigación.

Hasta el momento, todo el modelado que se ha hecho al respecto de la vía de señalización activada por speract, que desencadena las fluctuaciones de calcio en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar, se ha referido a una sola red, donde el estado de cada nodo representa valores de concentraciones de estos componentes, que se consideran distribuidos uniformemente a lo largo del flagelo, dada la resolución espacial que se tiene hasta el momento en los experimentos. Sin embargo, el flagelo es una estructura larga en la que pueden existir varias vías distribuidas a lo largo del flagelo en forma de “cúmulos” o grupos de señalización [11]. Una hipótesis plausible es que el fenómeno de aumento generalizado de calcio que se observa en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar al adicionar speract, obedece a la sincronización de cúmulos de señalización, los cuales están acoplados por medio de moléculas que aumentan su concentración por la activación de la vía. Esta molécula o mensajero servirá como enlace entre dichos cúmulos, difundiéndose a lo largo del flagelo y participando en la activación los cúmulos vecinos.

6.1 Misma vía de señalización, misma molécula activadora (speract), dos diferentes tipos de nado.

La vía de señalización que hemos modelado corresponde al espermatozoide del erizo de mar *S. Purpuratus*. Sin embargo, es necesario señalar que existe otra especie de erizo de mar, cuyo espermatozoide responde al mismo péptido speract, este es el erizo de mar *Lytechinus pictus*. La diferencia entre *L. pictus* y *S. purpuratus* es que el primero de ellos es quimiotáctico, es decir, que al detectar la molécula speract, se dirige a la fuente de donde proviene el speract, el ovocito de la hembra. En cambio, *purpuratus* no presenta quimiotaxis, solamente cambia la forma de su nado. Se cree que entre ellos, la vía de señalización activada por speract es prácticamente la misma. Entonces, ¿Qué es lo que bioquímicamente los diferencia?

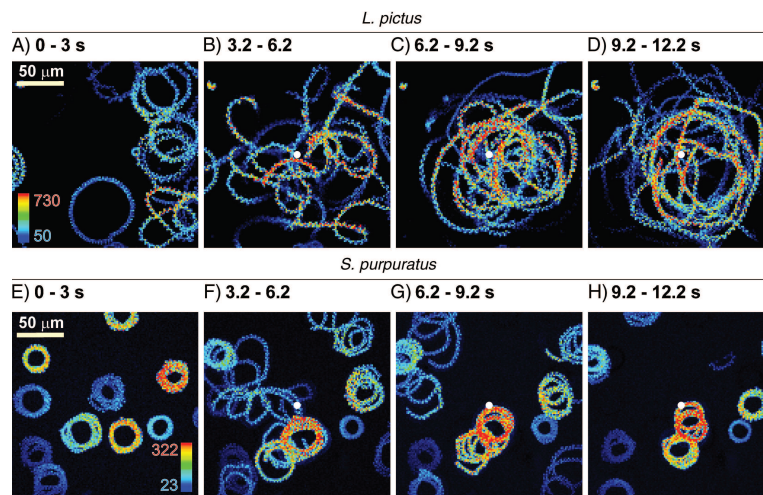


Figura 35. Diferencias entre el nado de los espermatozoides de erizo de mar *Lytechinus pictus* y *Strongylocentrotus purpuratus*, posterior a la liberación de un gradiente de speract que inicia en el centro de la imagen. A-D) secuencia de imágenes obtenidas a partir de la fluorescencia de la cabeza de los espermatozoides de *L. pictus*. Se observa el acercamiento al centro de la imagen por el grupo de espermatozoides. B) Secuencia de imágenes en las mismas condiciones para *S. purpuratus*. La intensidad de color muestra la intensidad de la fluorescencia del marcador de calcio fluo4 (Tomado de [39]).

Para esta parte del trabajo, la hipótesis que se plantea es que hay una diferencia en cómo se procesa la información entre ambas especies. Deben existir diferencias en la forma en que se conecta la parte bioquímica con la parte motora del flagelo, es decir, la vía de señalización que desencadena las oscilaciones de calcio y el axonema. Una posible explicación, es que existe una distribución diferente de componentes de la vía en cada una de las especies. Para explicar más a fondo este punto, es necesario hacer algunas aclaraciones de la bioquímica y la fisiología del espermatozoide.

En el flagelo del espermatozoide de *S. Purpuratus*, así como de otras especies que responden a moléculas activadoras del esperma, existe una gran cantidad de receptores a lo largo del flagelo. Se encuentran en el orden de decenas de miles por flagelo, es decir, entre 10 000 y 100 000 receptores por espermatozoide [14]. Esta es una adaptación para asegurar que el esperma presente una respuesta adecuada al estar cerca de estas moléculas. Es muy importante esta primera parte de la vía, puesto que la búsqueda del espermatozoide para encontrar el óvulo se hace en un volumen muy grande, entonces, tener un mecanismo eficiente de detección de moléculas provenientes del óvulo, así como un mecanismo

de procesamiento de la señal y de respuesta motora ágiles son indispensables para que se logre el objetivo único que tiene esta célula: fecundar al huevo.

Ahora, si bien existen decenas de miles de receptores, existen factores limitantes de otros componentes: por ejemplo, la cantidad de cGMP disponible dentro del flagelo, una vez que se ha activado la guanilato ciclasa, no excede la centena por flagelo, es decir, entre 10 y 100 moléculas de cGMP en todo el flagelo [57]. Éstas son las que se necesitan para generar la respuesta de calcio que observamos en un experimento. Por otro lado, los canales iónicos que existen en el flagelo del espermatozoide no exceden de cien o en el mejor de los casos, mil por espermatozoide. Con muy pocos canales, es posible generar las respuestas observadas, puesto que el volumen del flagelo es muy pequeño ($10^{-17}lt$) y los iones que se necesitan para cambiar el potencial de membrana también son pocos.

Tomando en cuenta las líneas anteriores, podemos establecer un posible mecanismo de diferenciación entre *L. pictus* y *S. purpuratus*: si bien ambos espermatozoides tienen la misma vía en cuanto a elementos participantes, su cantidad puede variar y el tiempo de respuesta a la señal en cada especie, estará determinado por el número de componentes totales de la vía. Un posible escenario es que el espermatozoide que presente una cantidad mayor de elementos, se pudiese sincronizar más rápido que el otro. Bajo esta perspectiva, el problema de la diferencia de nados pueda tratarse como un problema de sincronización.

6.2 ¿Cómo medir la sincronización?

Como primera aproximación, se puede asumir que los elementos de la red se encuentran distribuidos de manera homogénea a lo largo del flagelo y en proporciones similares entre una y otra especie. Por lo tanto, no podría haber diferencias entre la respuesta de uno y otro espermatozoide, ya que la señal se propagaría prácticamente al mismo tiempo.

Asumamos que existe una distribución diferenciada de los componentes de la red, como si estuvieran agrupados en “cúmulos” o módulos de señalización, donde cada uno de estos módulos está separado de los otros por cierta distancia, bajo estas condiciones se podrá tener una respuesta distinta dependiente de la distancia entre estos islotes de señalización, la cual va a determinar el tiempo en el que se sincronizan. De este modo, se puede asumir que el espermatozoide de *L. pictus* se sincroniza más rápido y que ésta sincronización rápida es lo

que le permite reaccionar ante cambios en el gradiente de speract en el medio, dando lugar a la quimiotaxis; *S. purpuratus* se sincroniza más lento y esto no le permite acoplar su maquinaria bioquímica y motora para seguir la fuente de speract.

Nos encontramos entonces, ante un problema de redes acopladas en el espacio. Un número determinado de redes, que tienen una variable que los acopla o sincroniza, esta variable es parte de la red y para el caso que nos ocupa, debe difundirse a lo largo del flagelo para poder servir como señal de enlace entre las redes vecinas.

Supongamos que la variable que sincronizará las redes va a ser el mismo ion calcio, puesto que es éste quien genera los cambios en el movimiento del espermatozoide, así que de alguna manera tiene que servir de enlace entre el axonema y la vía de señalización, como se muestra en la figura 36.

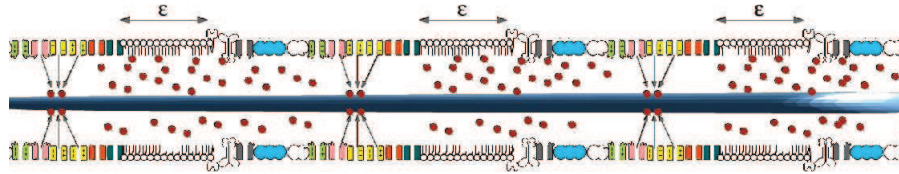


Figura 36. Representación esquemática de varias redes de señalización acopladas a lo largo del flagelo. Los círculos rojos representan moléculas de calcio. Las flechas con la letra ε representan la distancia que hay de separación entre los cúmulos de señalización.

En este tipo de modelos, es necesario establecer un parámetro de distancia para establecer las diferencias teóricas entre *L. pictus* y *S. purpuratus*. Este parámetro, que llamaremos epsilon (ε), va a significar el inverso de la distancia que existe entre dos cúmulos de señalización vecinos. Es decir, una ε muy pequeña, indicará que los módulos están muy separados, en cambio, una ε grande indica que los módulos están más cerca.

La forma en la que se van a acoplar los diferentes módulos va a ser con una ecuación de la forma siguiente:

$$Ca_i(t+1) = \mathbb{H} \left[\varepsilon \left(\frac{F(Ca_{i+1}(t)) + F(Ca_{i-1}(t))}{2} \right) + F(Ca_i(t))(1 - \varepsilon) \right]$$

donde se puede observar que el calcio en la posición i al tiempo $t+1$, va a depender de sus propios reguladores ($F(Ca_i(t))$), así como del valor del calcio de sus vecinos al tiempo t . De este modo se introduce una dependencia de la evolución del calcio con su posición. F es la función reguladora de calcio que

se ha utilizado desde el principio de este trabajo y \mathbb{H} es la función escalón que se utiliza para volver discreta la variable continua y así poder utilizar su valor dentro de la red lógica.

Con este formalismo se toma en cuenta la información posicional del elemento que acopla, en este caso el calcio. La variable ε nos va a indicar la intensidad con que se acoplan los iones calcio de cada red entre ellos. Una ε pequeña, nos indica un acoplamiento bajo, en cambio, una ε grande nos indica un acoplamiento fuerte. La variable ε varía entre 0 y 1, sin embargo, $\varepsilon > 2/3$ nos indicaría que el calcio en el sitio i va a depender más de sus vecinos que de sus propios reguladores, razón por la cual, los valores que nos interesan para este trabajo, van de 0 a $2/3$.

El hecho de que ε tome valores continuos, genera que la variable calcio se vuelva continua, pero como estamos haciendo un mapeo discreto, es necesario volver discreta a nuestra variable. Esto se logra con una función escalón \mathbb{H} , fijando umbrales θ_1 y θ_2 al valor de calcio. De modo que $\mathbb{H}(Ca)$ volverá discreta al nodo correspondiente al calcio de la siguiente forma:

$$\mathbb{H}(Ca) = \begin{cases} 0 \rightarrow \varepsilon < \theta_1 \\ 1 \rightarrow \theta_1 < \varepsilon < \theta_2 \\ 2 \rightarrow \varepsilon > \theta_2 \end{cases}$$

El tiempo transitorio de acoplamiento de las redes, se puede relacionar con el tiempo que le lleva al espermatozoide sincronizar la bioquímica interna del flagelo para generar una respuesta colectiva en un tiempo característico. Este tiempo característico está relacionado con la sincronización entre la bioquímica y el motor molecular que genera el nado en el flagelo. Lo que se va a medir como tiempo de sincronización, será el tiempo transitorio, es decir, el tiempo que le toma a todas las redes acopladas, tener una respuesta periódica. En otras palabras, tener un atractor de varias redes acopladas.

6.3 ¿Cuántas redes hay que acoplar?

En artículos previos se menciona que debe haber aproximadamente 10 cúmulos de señalización, separados por alrededor de $5\mu m$ [11]. Por lo tanto, como primera aproximación se acoplaron 10 redes a distintos valores de ε , midiendo el tiempo que le toma a las 10 redes, con condiciones iniciales aleatorias, llegar a un atractor.

6.3.1 Análisis de los transitorios dependiendo del acoplamiento

En la figura 37, variando ε , los promedios de 1000 condiciones iniciales de los tiempos transitorios cambian drásticamente, se ve una discontinuidad claramente a valores de $\varepsilon = 0.5$ y $\varepsilon = 0.75$. Para valores de ε pequeños, es prácticamente lo mismo que no tener acoplamiento, es decir, que el tiempo transitorio es el mismo que con redes solas; cada red tiene su propio tiempo transitorio, entonces, los transitorios de las 10 redes acopladas darán lugar a una distribución de tiempos semejante a la de redes tomadas individualmente. Al pasar cierto valor (que en este caso es 0.25, 0.5 y 0.75; situación que discutiremos en la siguiente sección) vienen los cambios más visibles. En $\varepsilon = 0.5$ se vuelve un tiempo transitorio cercano a 200 pasos de tiempo en promedio. Finalmente, en 0.75 se regresa a un tiempo considerablemente más corto.

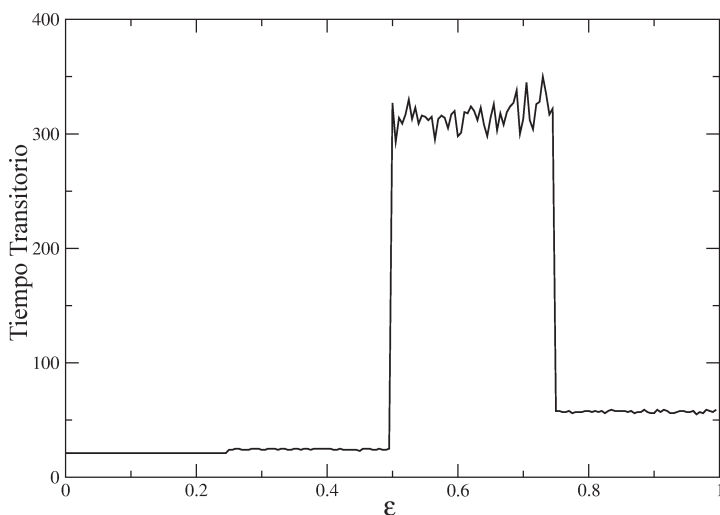


Figura 37. Transitorios dependiendo del valor del parámetro de acoplamiento ε . Cada punto de esa gráfica se obtiene promediando 10 000 condiciones iniciales acoplando 10 redes. Se pueden observar las discontinuidades en los valores de ε de 0.25, 0.5 y 0.75.

6.3.2 ¿Por qué esa discontinuidad en los transitorios?

Las discontinuidades observadas en la figura 37 se pueden interpretar a partir de las distribuciones de la figura 38. A distintos valores de ε , los transitorios varían de maneras también distintas. En el primer régimen ($\varepsilon < 0.25$), no hay

fluctuaciones en el promedio del valor del transitorio, 22 pasos, tal como en el WT de una sola red. La distribución de los transitorios parece seguir una gaussiana (Figura 38A). En el segundo régimen ($0.25 < \varepsilon < 0.5$), empieza a haber fluctuaciones pero son muy pequeñas, de hecho, sigue siendo prácticamente una línea horizontal alrededor de 27 pasos y la distribución sigue comportándose de manera gaussiana (Figura 38B). En el tercer régimen ($0.5 < \varepsilon < 0.75$), las fluctuaciones del transitorio promedio son muy grandes y aunque se encuentran varios valores en el rango de los 300 y 500 pasos (34.1 %), sin embargo, la distribución presenta una cola larga, es decir, muchas condiciones llevan a transitorios largos (Figura 38C). El cuarto régimen parece seguir una distribución bimodal (Figura 38D).

Acoplado Calcio

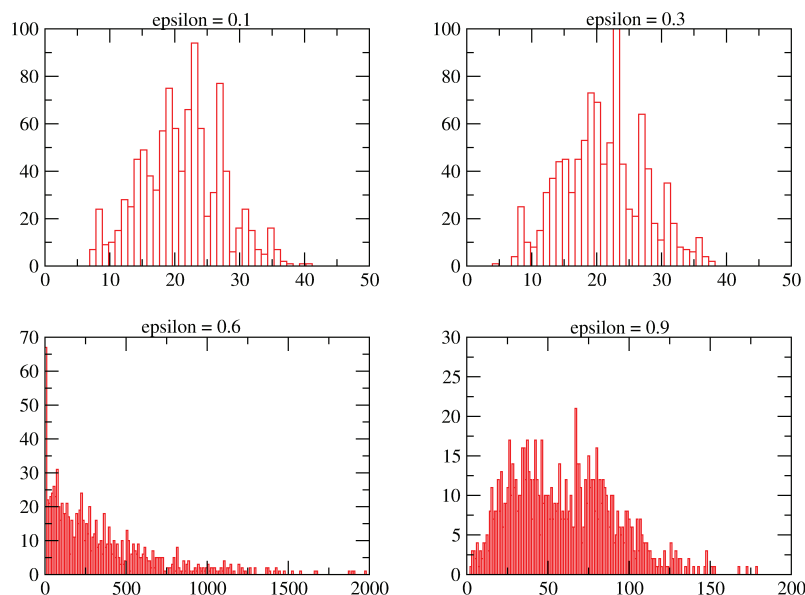


Figura 38. Histogramas de frecuencias de tiempos transitorios de sincronización de 10 redes acopladas dependiendo del valor de ε . A) $\varepsilon = 0.1$. Se puede observar el pico de sincronización cercano a 20 pasos de tiempo. B) $\varepsilon = 0.3$ Es muy similar a A). C) $\varepsilon = 0.6$. Esta distribución presenta una cola larga, observándose una concordancia con la figura 37. Después de $\varepsilon = 0.5$, la sincronización es más lenta. D) $\varepsilon = 0.9$ La distribución de los tiempos transitorios parece seguir una distribución bimodal.

Estos resultados son difíciles de interpretar, ya que cada paso en la evolución de la dinámica es conmensurable con eventos de activación de moléculas o apertura y cierre de canales (estos eventos tardan decenas o centenas de milise-

gundos), tener transitorios de 1500 pasos de tiempo resulta lejano al tiempo de respuesta que se presenta en un proceso de quimiotaxis, el cual dura aproximadamente 3 segundos. En el capítulo 1, se mencionó que cada evento dentro de la vía de señalización activada por speract tenía una duración de decenas o centenas de milisegundos. Por construcción del modelo, cada paso de tiempo en la simulación, puede considerarse de ese orden. Haciendo un símil entre los tiempos de la bioquímica con los tiempos discretos de la simulación, tener transitorios de 1500 pasos no refleja el tiempo que lleva el proceso de detección de speract, activación de la vía, fluctuaciones de calcio y redireccionamiento del nado. Debe haber algo que falta asumir en el modelo del acoplamiento, pues este último debe ser un proceso rápido.

Hasta el momento se ha mencionado la importancia de las variaciones de ε , sin embargo, no se ha hablado del valor de los umbrales θ que vuelven discreto el valor del calcio. Para simplificar el cálculo, se fijaron los valores de θ_1 y θ_2 en 0.5 y 1.5 respectivamente. Al cambiar los valores asignados a los umbrales, el punto donde ocurren las fluctuaciones en los transitorios también cambia (Figura 39).

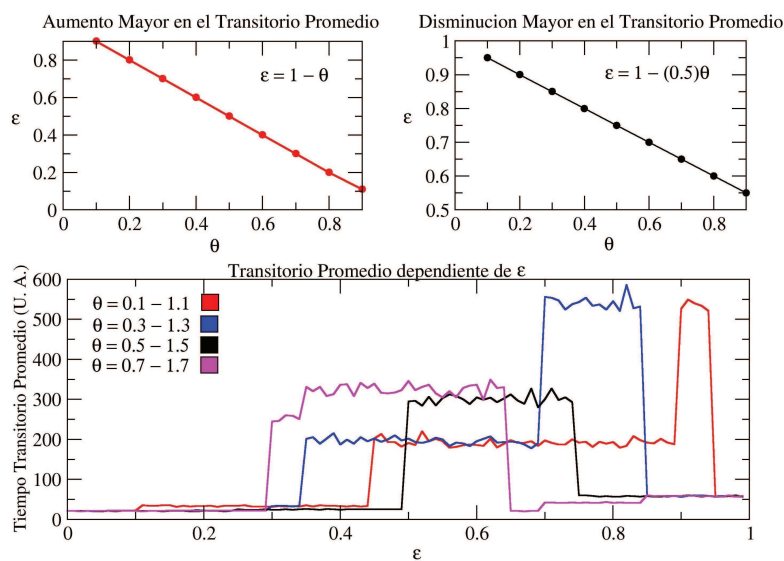


Figura 39. Análisis de los tiempos transitorios dependiendo del umbral de discretización θ . A) Gráfica que muestra el valor de ε y θ para los cuales ocurre el mayor aumento en el transitorio promedio. B) Valores de ε y θ para los cuales ocurre la disminución en el transitorio promedio. C) Variaciones en los tiempos transitorios promedio dependiendo del umbral de discretización del calcio θ_1 y θ_2 . Cada línea representa un par de valores de θ .

Lo importante de este resultado es que, independientemente del valor del umbral o del valor del término de acoplamiento, siempre hay un cambio el tiempo transitorio promedio. Situación que hace suponer un comportamiento genérico en la existencia de cambios en los tiempos transitorios.

6.4 Flagelo isopotencial

Imaginemos una neurona: Es una célula particularmente interesante, ya que su morfología es cualitativamente diferente a la del resto de los tipos celulares (Fig 40). Tiene un soma o cuerpo y un axón, el cual es un tubo largo donde se propaga el potencial de acción, dado por las diferencias de cargas entre la parte externa y la interna de la membrana. El potencial de acción se propaga desde el final del axón al soma o viceversa. Para los fines de este trabajo, hay que resaltar que las características físicas y geométricas del axón le permiten transmitir el potencial de acción de manera casi instantánea. Debido a que el flagelo del espermatozoide tiene una forma similar al axon, podemos asumir que el voltaje se propaga de manera casi instantánea en el flagelo, es decir, una variación del voltaje en cualquier zona del flagelo se verá de la misma manera en el resto de él. El voltaje se puede considerar isopotencial en el espermatozoide.

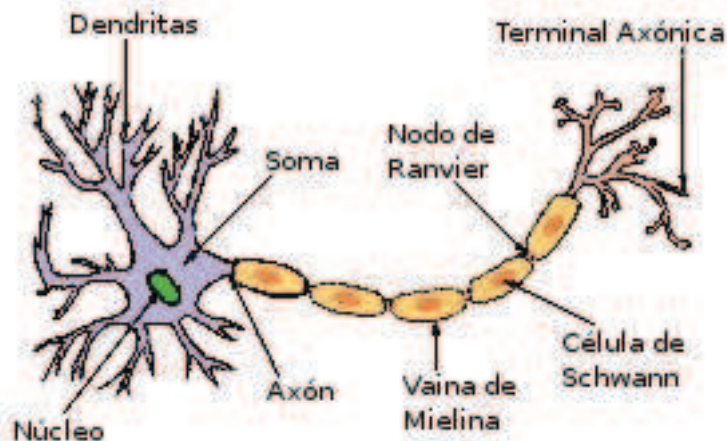


Figura 40. Estructura de la neurona. En la figura se observa el soma (en violeta) y el axón, constituido por estructuras llamadas nodos de Ranvier, que aíslan la membrana en esa zona del axón, lo que permite conducir de manera casi instantánea el potencial de acción de la neurona. La longitud del axón hace que se pueda hacer una analogía con el flagelo y, de esta forma pensar en que el flagelo es isopotencial.

6.4.1 Cómo modelar el voltaje isotencial

Como primera aproximación, se toman las 10 redes acopladas a un tiempo t y se evoluciona la red un paso de tiempo. El valor del voltaje de cada red en ese paso de tiempo se suma y se divide entre el total de redes (en este caso 10). Una vez tomado el valor promedio del voltaje, se hace una función escalón similar a lo que se hizo con el calcio. En este caso, el umbral lo fijamos en $2/3$ y $4/3$ para cambiar de 0 a 1 y de 1 a 2, respectivamente. El valor que resulte de esa operación se asignará al voltaje de cada una de las redes. Eso implicará que el voltaje a lo largo del flagelo tomará el mismo valor en todas las redes, y variará para el próximo caso de acuerdo a los reguladores del voltaje.

Con el voltaje isotencial, la gráfica de los transitorios a distintos valores de ε cambia drásticamente (Fig 41):

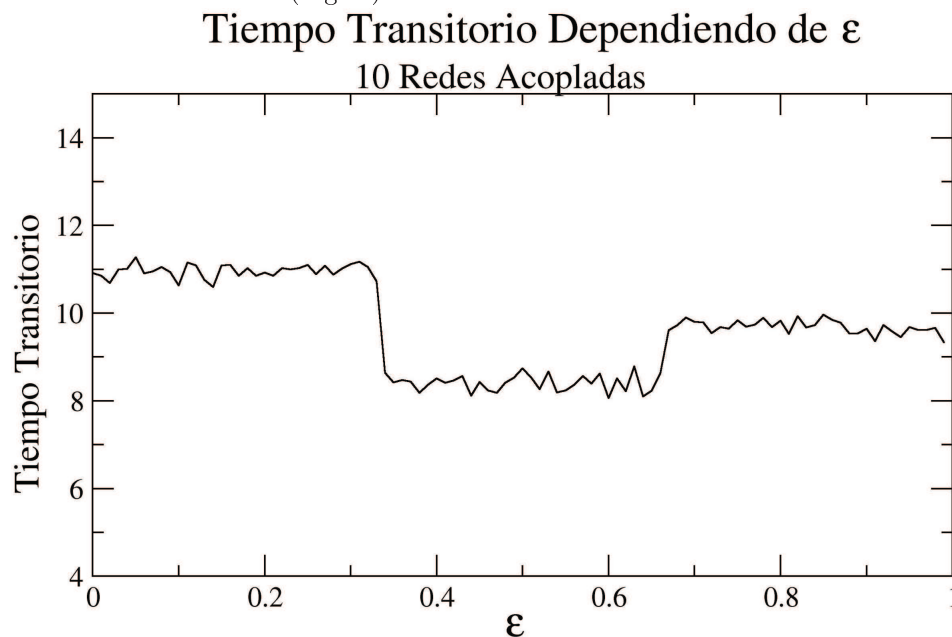


Figura 41. Transitorios dependiendo de ε con un voltaje isotencial. Nótese el cambio de escala de tiempo comparándose con el acoplamiento no isotencial. En este caso, el tiempo de sincronización mayor es aproximadamente 12, que es cuando no hay acoplamiento.

Ahora hay que explicar varios puntos con respecto a esta figura:

1. El tiempo transitorio se reduce fuertemente al hacer el voltaje isotencial, incluso es menor que la red WT sin acoplar. Este es un punto fundamental en el trabajo. El hecho de tener una célula isotencial gen-

era un transitorio mucho menor. La longitud del flagelo debe tener un tamaño determinado para poder lograr esto. Esto nos lleva a pensar en un problema de densidad en los componentes de la vía dentro del flagelo del espermatozoide.

2. Solamente hay dos discontinuidades, en cambio, en el primer caso hay 3.
3. La transición del primer al segundo régimen es de un transitorio mayor a uno menor conforme crece ε . Esto tiene mayor sentido, ya que al acoplarse los diferentes cúmulos de señalización, la sincronización aumenta, como es de suponerse.
4. Valores de ε mayores a $2/3$ no tienen sentido biológico, ya que esto implica que el calcio del sitio i va a depender más de sus vecinos que de sus propios reguladores. Por lo tanto, se puede asumir que solamente se tiene una transición de fase alrededor del umbral fijado.

Capítulo 7

Consideraciones finales

A lo largo de este trabajo se intentó reproducir la vía de señalización activada por speract en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar, utilizando el formalismo de redes lógicas. Se realizaron diversos cálculos, todos basados en evidencia experimental obtenida previamente, concordando el modelo con el experimento. Dentro de los principales resultados obtenidos podemos enlistar los siguientes:

1. A partir de modelos discretos es posible reproducir los eventos involucrados en la vía de señalización activada por speract en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar.
2. El modelo lógico es capaz de dar lugar a predicciones que pueden ser corroboradas a través de nuevos experimentos.
3. Con este formalismo es posible observar el efecto de fármacos con muchos blancos. Este modelo además puede determinar el efecto que tiene dicha droga sobre cada canal en particular, así como el efecto global de la droga.
4. Con el modelo de red que se construyó es posible observar el régimen dinámico en el que opera la red. La red construída resulta estar en el régimen crítico, situación que refuerza la idea de que la vida está en un estado límite entre el orden y el caos.
5. Con este modelo se pudo predecir la función de un canal iónico como CatSper en el contexto de su importancia para la vía de señalización activada por speract en el espermatozoide de erizo de mar.
6. Con la inclusión de CatSper en la vía de señalización, se resolvieron controversias existentes anteriormente. Tal es el caso del efecto que tenía el ácido niflúmico sobre los canales de potasio activados por calcio (CaKC) y el efecto de iberiotoxina sobre la vía de señalización. Estas inconsistencias y su respectiva solución (la inclusión de CatSper), muestran que la red tiene la propiedad de ser robusta para mantener la gran mayoría de características generales que en un principio se habían observado sin CatSper y, a su vez ser flexible para adquirir nuevos elementos que proveen mejoras al modelo.
7. Con este trabajo se pudieron identificar nodos esenciales por tres diferentes métodos. Los nodos resultantes en los tres casos son concordantes. La existencia de elementos redundantes en la vía de señalización puede

ser un indicativo del camino evolutivo que las especies han adquirido para lograr su preservación en distintos escenarios.

8. Se logró acoplar varias redes en el espacio, generando resultados relevantes a los tiempos característicos de respuesta a un estímulo. Otro resultado importante es que el modelo mostró que el flagelo tiene que ser una estructura en la que el potencial de membrana sea igual en todo lugar. Este último resultado le confiere al GMP cíclico una importancia que antes no se había señalado, ya que es el único elemento que se mueve dentro del flagelo antes del primer cambio en el potencial de membrana. Este hecho debe ser estudiado con más cuidado.

Existe también una serie de situaciones que no puede describir este modelo. Aquí se enlistan las principales:

1. La dinámica temporal de los elementos participantes en la vía de señalización.
2. El número de elementos participantes y las concentraciones de las moléculas.
3. La existencia de los nodos predichos. Se necesita mayor evidencia experimental.
4. La existencia de islotes de señalización.
5. La sincronización no permite establecer el orden de activación de los nodos posteriores a la repolarización debido a la entrada de calcio.

Ante la evidencia mostrada en los capítulos anteriores, lo que podemos sugerir de lo que debe ser la vía de señalización activada por speract es lo siguiente:

El espermatozoide, siguiendo un nado circular, detecta a lo largo de su flagelo una o varias moléculas de speract, la unión de speract con su receptor activa una guanilato ciclase acoplada al receptor. En este momento asumimos que por cada receptor, hay una molécula de Guanilato ciclase acoplada a éste. Por lo tanto, la respuesta de GC es altamente probable, lo que implica que cada vez que se forme un complejo speract-receptor, se formará cGMP. La cantidad de cGMP dentro del flagelo es muy baja, llega a decenas al estar activada la GC [57]. Sin embargo, la acción de las fosfodiesterasas es muy rápida, lo que provoca que en poco tiempo se degraden las moléculas de cGMP. Esto adquiere muchísima importancia en el contexto de la distribución de canales KCNG a

lo largo del flagelo: el viaje de las moléculas de cGMP hacia los canales KCNG debe ser lo suficientemente corto para asegurar que se va a llegar a éstos antes de que las PDEs lo degraden. Por lo tanto, la distribución de canales KCNG debe ser muy eficiente en el sentido de minimizar la distancia entre la GC y los canales mismos. Suponer esto, nos lleva a dos posibilidades:

- o bien los canales están distribuidos individualmente de manera homogénea o,
- están en grupos muy cercanos y entre estos grupos hay una distancia más grande.

Este tipo de situaciones quedan pendientes para hacer experimentos al respecto.

Una vez que se han abierto los canales de potasio KCNG, la hiperpolarización que conlleva esta apertura, produce una serie de procesos que ocurren de manera más o menos simultánea: la activación de los intercambiadores NCE y NHE, que por un lado dejan entrar sodio a la célula y a cambio sacan, ya sea protones (NHE) o calcio (NCE). Esta disminución de la concentración de calcio intracelular, aún no se ha comprendido su función dentro de esta vía de señalización. Otro de los efectos de la hiperpolarización es la activación de una adenilato ciclasa, la cual es soluble y produce cAMP. La producción de cAMP permite la apertura de los canales HCN que promueven el ingreso de sodio y provocan la depolarización necesaria para inactivar los intercambiadores previamente mencionados, así como también abren otros canales de calcio voltaje-dependientes: los HVA y LVA. Al alcalinizarse la célula por la actividad del NHE, se abren los canales CatSper y permiten el ingreso de calcio a la célula de manera más profusa. Una vez que ha entrado el calcio en la célula, los mecanismos de extrusión de calcio empiezan a actuar: las bombas CaP y el intercambiador NCE. Por otro lado, el calcio se debe empezar a unir a las moléculas que van a producir el movimiento, ya sea una calmodulina, calnexinas u otro tipo de proteínas que estén ancladas al axonema y sean activadas por calcio. La otra cantidad de calcio que se usa es el que interviene en la apertura de los canales de cloro y potasio calcio-dependientes, CaCC y CaKC que hiperpolarizan la célula al abrirse y dejan entrar cloro o dejar salir potasio.

Todos los elementos de la red que son voltaje-dependientes, pueden estar homogéneamente distribuidos o no, realmente puede no importar tanto, puesto que el voltaje es único en la célula, es decir, al abrirse un canal iónico, el efecto

que tendrá en la membrana será global, toda la membrana del flagelo tendrá el mismo voltaje.

Se sabe que existen vías rápidas y lentas de calcio en varios tipos celulares, donde la temporalidad y la frecuencia de las oscilaciones de calcio es determinante de la respuesta de la célula ante un estímulo. El espermatozoide no es la excepción, presenta vías rápidas y lentas de calcio; es muy probable que la frecuencia en las oscilaciones de calcio en estas vías determine la forma de la respuesta del flagelo. Existe evidencia que aumentos grandes de calcio, no siempre conducen a cambios en la curvatura del flagelo [22]. Concentraciones bajas de speract, (1nM) generan un retraso grande en la aparición de la primera fluctuación de calcio, con respecto a concentraciones mayores (100nM). Mientras que a concentraciones altas de speract, la primera fluctuación de calcio ocurre dentro de los primeros 250 mseg posteriores a la liberación de speract, a concentraciones de 1nM la primera fluctuación ocurre después de los 1 300 mseg. Por lo tanto, el aumento en la concentración de calcio es necesario mas no suficiente para generar el cambio en la curvatura. El conjunto de factores necesario para cambiar la forma en la que nada el espermatozoide debe incluir necesariamente la frecuencia de oscilaciones de calcio. La frecuencia de las oscilaciones de calcio debe estar regulada por la apertura y cierre de los canales de calcio y de la actividad de sus mecanismos de extrusión, así como de la distancia entre los islotes de señalización. La distancia entre islotes es fundamental para la primera fluctuación de calcio. Todo esto nos hace ver que muy probablemente el nodo que necesita acoplar las redes es el cGMP, ya que los canales de calcio se abren una vez que el flagelo se ha hiperpolarizado, y esto ocurre cuando el flagelo ya es equipotencial. La manera en que se distribuye el cGMP a lo largo del flagelo, depende de las ciclasas, que a su vez están acopladas a los receptores a speract. Los resultados aquí presentados se calcularon con el calcio como elemento acoplador. Una buena sugerencia para trabajo futuro es observar el efecto de acoplar cGMP y variar el número de redes para establecer el número óptimo de cúmulos de señalización para tener una respuesta en el nado del espermatozoide.

Dentro del estudio que nos ocupa, una de las preguntas más relevantes es cómo la existencia de una vía tan conservada a lo largo de la evolución, permita tener comportamientos diferentes en distintas especies dependiendo de su ambiente. En el caso del espermatozoide de *S. Purpuratus*, al responder a speract no se presenta quimiotaxis, la respuesta que se observa en el movimiento del esperma no está dirigido hacia el huevo. Esto puede tener una implicación

ecológico-evolutiva: Esta especie vive muy cerca de la costa, a muy pocos metros de las orillas, por lo tanto, siempre están en un medio altamente turbulento. Seguir un gradiente de concentración en un medio en el que constantemente se cambia de posición por influencias externas, no parece ser una buena estrategia. Los espermatozoides de *S. purpuratus* pueden responder a speract y cambiar la forma de su nado, de una manera más o menos aleatoria dentro de una distancia más o menos grande. De modo tal que si hay speract circundante, se maximiza la posibilidad de encuentro entre óvulo y esperma si el esperma se mueve con mayor velocidad y explorando un volumen mayor, esta última situación se produce cuando el espermatozoide detecta estas moléculas.

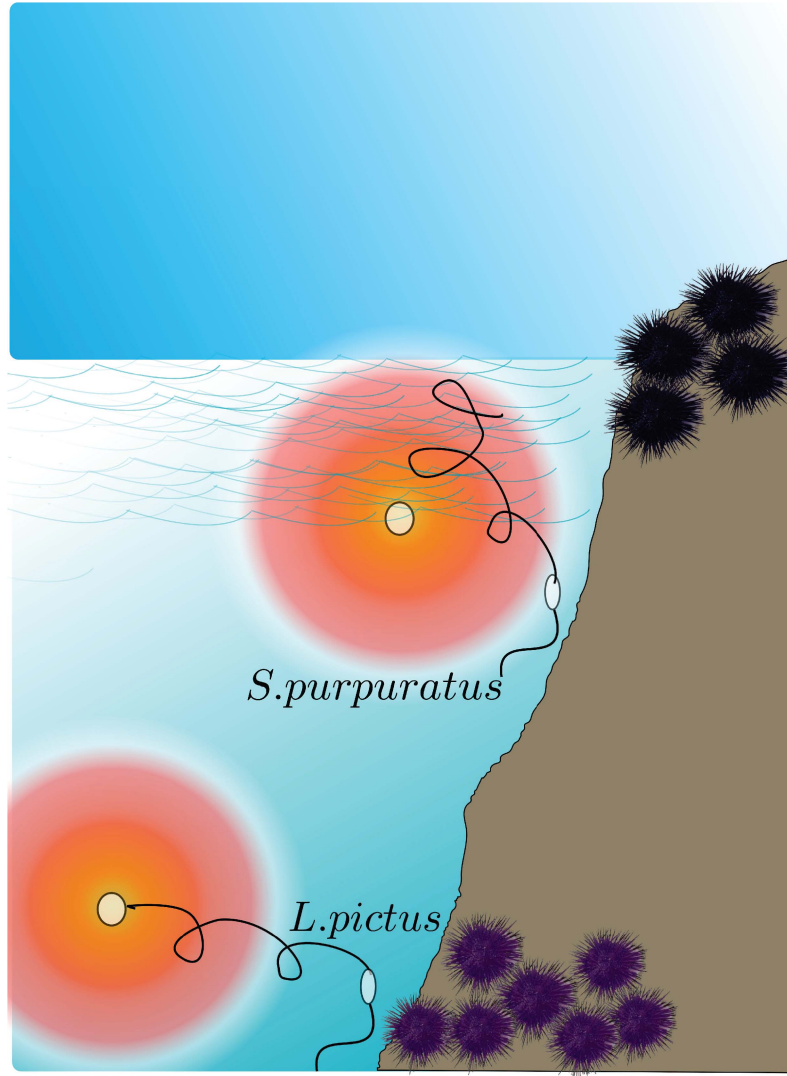


Figura 42. Representación del ambiente en que viven los erizos de mar *S. Purpuratus* y *L. pictus*. El huevo (círculo blanco) libera sus moléculas de speract desde la capa más externa y éstas difunden en el mar. Tiempodespués, el esperma las detecta y nada de acuerdo a dicho estímulo. Una hipótesis es que, *S. purpuratus*, al vivir cerca de la costa, su medio es altamente turbulento, por lo que acercarse al huevo no es una correcta estrategia de búsqueda. En cambio, *L. pictus*, que habita a mayores profundidades, sí le conviene acercarse al huevo, ya que no hay mareas tan fuertes como en la costa.

L. pictus, es quimiotáctico, se acerca a la fuente del gradiente, es decir, al huevo. Este erizo de mar vive a varios metros de profundidad, donde el efecto de las mareas casi no es perceptible. No hay turbulencias grandes ni perturbaciones a su medio. Por lo tanto, contar con la maquinaria necesaria para establecer un enlace entre la vía de señalización bioquímica activada por speract, con el movimiento de giro pronunciado seguido de un nado recto para de este modo acercarse al huevo, constituye una buena estrategia para lograr la fecundación.

Lo más impresionante del hecho de que una especie presente quimiotaxis y la otra no, es que ambos comparten la misma vía de señalización, responden a speract y cuentan con prácticamente los mismos componentes. Por otro lado están separados por millones de años de evolución [14]. La conservación de la vía de señalización nos habla de la utilidad de la vía y a su vez, nos da un indicativo de la robustez bioquímica de la misma. Existen elementos fundamentales dentro de esta red que son compartidos por varias especies [27, 5, 6, 39, 57, 14, 11, 22], lo cual nos sigue hablando de la estabilidad de nuestra vía, que a su vez, se combina con la propiedad de evolucionar ante cambios medioambientales o de otra índole. Esta confluencia de robustez con evolucionabilidad se observa muy frecuentemente en redes que son críticas, precisamente porque existen la cualidad de soportar alteraciones y hacerlas neutras, almacenarlas o utilizarlas, dependiendo de las condiciones en las que se encuentre el sistema [26, 42, 52, 51, 6, 53, 54, 55, 18].

Como ejemplo de esto, podemos hablar de la existencia de los nodos redundantes en nuestra red, que si bien la gran mayoría de ellos ha sido observado experimentalmente, la preponderancia de éstos en la fisiología de la vía de señalización y la motilidad del espermatozoide no es del todo clara. En este trabajo, a la luz de los resultados obtenidos, podemos suponer que hay elementos que sirven como sustitutos, en caso de alguna falla en los componentes principales. A esto se le conoce como redundancia. Por ejemplo, la primera hiperpolarización se lleva a cabo por un canal de potasio dependiente de cGMP. Si este canal fallara, existen otros canales capaces de hiperpolarizar a la célula, tal es el caso del canal CaKC, que es sensible a calcio. Otro ejemplo nos lo da el canal HCN, que deja ingresar sodio a la célula. En caso de que exista un mal funcionamiento de este canal, existen canales de calcio que pueden cumplir con la función de repolarizar a la célula, tal es el caso del canal CatSper, puesto que es sensible a voltaje. El mantenimiento de los ciclos de hiperpolarización-repolarización necesarios para el correcto movimiento del espermatozoide en su búsqueda por

el óvulo es la piedra angular del sistema. Esto es mantenido en todas las especies que aquí se tratan: *A. punctulata*, *L. pictus* y *S. purpuratus*. Por lo tanto, la evolución de estas vías de señalización bioquímica debió presentarse en un antecesor común, en una forma más primitiva con menos componentes. Una posible vía inicial podría ser la que se observa en la figura 43, con mucho menos componentes, pero con la maquinaria necesaria para mantener fluctuaciones en el potencial de membrana y en el calcio. Probablemente esos no son los canales originales, puesto que también han evolucionado, sin embargo, la estructura inicial se ha mantenido.

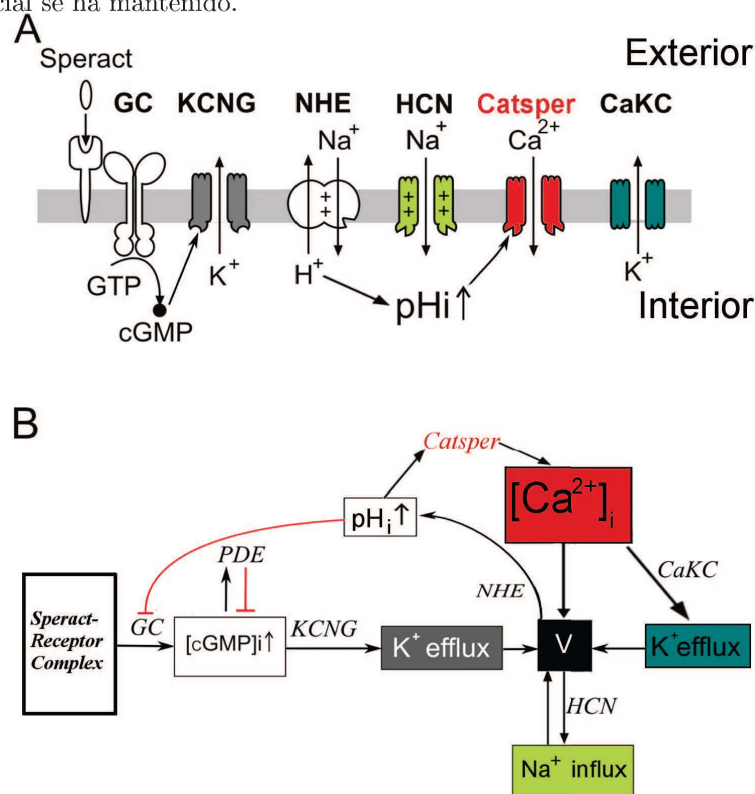


Figura 43. Red reducida, probablemente este es el conjunto de elementos básicos necesarios para todos los espermatozoides que responden a estos péptidos. Iniciando con la unión del ligando con el receptor, desencadenando la cascada de señalización que culmina con la serie de oscilaciones en la concentración de calcio intracelular que genera el movimiento del espermatozoide en su búsqueda por el óvulo.

Finalmente, es importante señalar que con este trabajo, una contribución fundamental al problema de la fecundación es que, con un enfoque de Biología

de Sistemas utilizando un modelo lógico apoyado fuertemente por conocimiento experimental previo, es posible descubrir relaciones funcionales dentro de la vía de señalización que sería difícil conocer por medio de un enfoque completamente experimental. Más aún, las propiedades globales que surgen de la dinámica propia del sistema, que no pueden ser medidas experimentalmente, como la criticalidad o la robustez, refuerzan el hecho de que la complejidad de los sistemas vivos puede llegar a visualizarse un poco más al utilizar herramientas como las presentadas dentro de esta tesis.

Para una comprensión de la fecundación hay que tener presente que el problema presenta una jerarquía de niveles de descripción que se encuentran fuertemente interrelacionados. Aquí nos hemos centrado en la escala de reacciones bioquímicas quedando abierta la investigación al nivel de nanomáquinas, de interacciones hidrodinámicas, de comportamientos colectivos, de variaciones ambientales. El reto final es poder integrar el conocimiento entre los diferentes niveles de organización. La tesis aquí presentada es parte de ese reto.

Bibliografía

- [1] Kondrashov AS (1988) Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature* 336: 435–440.
- [2] Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, et al. (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413: 603–609.
- [3] Zimmer RK, Riffell JA (2011) Sperm chemotaxis, fluid shear, and the evolution of sexual reproduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 13200–13205.
- [4] Wood CD, Darszon A, Whitaker M (2003) Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *J Cell Biol* 161: 89–101.
- [5] Darszon A, Guerrero A, Galindo BE, Nishigaki T, Wood CD (2008) Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *Int J Dev Biol* 52: 595–606.
- [6] Espinal J, Aldana M, Guerrero A, Wood C, Darszon A, et al. (2011) Discrete dynamics model for the speract-activated ca^{2+} signaling network relevant to sperm motility. *PLoS One* 6: e22619.
- [7] Hansbrough JR, Garbers DL (1981) Speract. purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J Biol Chem* 256: 1447–52.
- [8] Dangott LJ, Garbers DL (1984) Identification and partial characterization of the receptor for speract. *J Biol Chem* 259: 13712–6.
- [9] Garbers D (1976) Sea urchin sperm guanylate cyclase. Purification and loss of cooperativity. *Journal of Biological Chemistry* 251: 4071.

- [10] Garbers DL, Chrisman TD, Wiegand P, Katafuchi T, Albanesi JP, et al. (2006) Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends Endocrinol Metab* 17: 251–8.
- [11] Strücker T, Weyand I, Bönigk W, Van Q, Loogen A, et al. (2006) A k⁺-selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm. *Nat Cell Biol* 8: 1149–54.
- [12] Galindo BE, Neill AT, Vacquier VD (2005) A new hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel from sea urchin sperm flagella. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 96–101.
- [13] Galindo BE, de la Vega-Beltrán JL, Labarca P, Vacquier VD, Darszon A (2007) Sp-tetrahra: A novel cyclic nucleotide-gated k⁽⁺⁾ channel. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 668–75.
- [14] Nishigaki T, Wood CD, Tatsu Y, Yumoto N, Furuta T, et al. (2004) A sea urchin egg jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca⁽²⁺⁾ before its increase. *Dev Biol* 272: 376–88.
- [15] Glass L, Kauffman SA (1973) The logical analysis of continuous, non-linear biochemical control networks. *J Theor Biol* 39: 103–29.
- [16] Albert R, Othmer HG (2003) The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the segment polarity genes in *Drosophila melanogaster*. *J Theor Biol* 223: 1–18.
- [17] Espinosa-Soto C, Padilla-Longoria P, Alvarez-Buylla ER (2004) A gene regulatory network model for cell-fate determination during *Arabidopsis thaliana* flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles. *Plant Cell* 16: 2923–39.
- [18] Li F, Long T, Lu Y, Ouyang Q, Tang C (2004) The yeast cell-cycle network is robustly designed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4781–6.
- [19] Kauffman SA (1969) Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *J Theor Biol* 22: 437–67.
- [20] Huang S, Ingber DE (2000) Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. *Exp Cell Res* 261: 91–103.

- [21] Wood CD, Nishigaki T, Furuta T, Baba SA, Darszon A (2005) Real-time analysis of the role of Ca^{2+} in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *J Cell Biol* 169: 725–31.
- [22] Wood CD, Nishigaki T, Tatsu Y, Yumoto N, Baba SA, et al. (2007) Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar Ca^{2+} spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility. *Dev Biol* 306: 525–37.
- [23] Perez-Reyes E (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83: 117–61.
- [24] Beltrán C, Zapata O, Darszon A (1996) Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylyl cyclase. *Biochemistry* 35: 7591–8.
- [25] Aldana M, S C, LP K (2003) Boolean dynamics with random couplings. In: *Perspectives and problems in nonlinear science*, Kaplan E, Marsden JE, Sreenivasan KR (Springer NY), volume in Honor of Lawrence Sirovich of *Springer Applied Mathematical Sciences*. pp. 23–89.
- [26] Aldana M, Balleza E, Kauffman S, Resendiz O (2007) Robustness and evolvability in genetic regulatory networks. *Journal of theoretical biology* 245: 433–448.
- [27] Alvarez L, Dai L, Friedrich BM, Kashikar ND, Gregor I, et al. (2012) The rate of change in Ca^{2+} concentration controls sperm chemotaxis. *J Cell Biol* 196: 653–663.
- [28] Cheng L, Sanguinetti MC (2009) Niflumic acid alters gating of hcn2 pacemaker channels by interaction with the outer region of s4 voltage sensing domains. *Mol Pharmacol* 75: 1210–1221.
- [29] Espinosa F, de la Vega-Beltrán JL, López-González I, Delgado R, Labarca P, et al. (1998) Mouse sperm patch-clamp recordings reveal single Cl^- channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett* 426: 47–51.
- [30] Greenwood IA, Leblanc N (2007) Overlapping pharmacology of Ca^{2+} -activated Cl^- and K^+ channels. *Trends Pharmacol Sci* 28: 1–5.

- [31] Greenwood IA, Large WA (1995) Comparison of the effects of fenamates on Ca^{2+} -activated chloride and potassium currents in rabbit portal vein smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 116: 2939–2948.
- [32] Hogg RC, Wang Q, Large WA (1994) Action of niflumic acid on evoked and spontaneous calcium-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br J Pharmacol* 112: 977–984.
- [33] Janssen LJ, Sims SM (1992) Acetylcholine activates non-selective cation and chloride conductances in canine and guinea-pig tracheal myocytes. *J Physiol* 453: 197–218.
- [34] Li L, Ma KT, Zhao L, Si JQ (2008) Niflumic acid hyperpolarizes the smooth muscle cells by opening Ca^{2+} channels through ryanodine-sensitive Ca^{2+} release in spiral modiolar artery. *Sheng Li Xue Bao* 60: 743–750.
- [35] Ottolia M, Toro L (1994) Potentiation of large conductance K^{+} channels by niflumic, flufenamic, and mefenamic acids. *Biophys J* 67: 2272–2279.
- [36] Pacaud P, Loirand G, Lavie JL, Mironneau C, Mironneau J (1989) Calcium-activated chloride current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflugers Arch* 413: 629–636.
- [37] Satoh TO, Yamada M (2001) Niflumic acid reduces the hyperpolarization-activated current (I_h) in rod photoreceptor cells. *Neurosci Res* 40: 375–381.
- [38] White MM, Aylwin M (1990) Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca^{2+} -activated Cl^{-} channels in xenopus oocytes. *Mol Pharmacol* 37: 720–724.
- [39] Guerrero A, Nishigaki T, Carneiro J, Tatsu Y, Wood CD, et al. (2010) Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Dev Biol* 344: 52–65.
- [40] Guerrero A, Wood CD, Nishigaki T, Carneiro J, Darszon A (2010) Tuning sperm chemotaxis. *Biochem Soc Trans* 38: 1270–4.
- [41] Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, et al. (2012) The Ca^{2+} channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J* 31: 1654–1665.

- [42] Balleza E, Alvarez-Buylla E, Chaos A, Kauffman S, Shmulevich I, et al. (2008) Critical dynamics in genetic regulatory networks: examples from four kingdoms. *PLoS One* 3: e2456.
- [43] Chialvo D (2006) Psychophysics: Are our senses critical? *Nature Physics* 2: 301–302.
- [44] Kinouchi O, Copelli M (2006) Optimal dynamical range of excitable networks at criticality. *Nature Physics* 2: 348–351.
- [45] Derrida B, Pomeau Y (1986) Random networks of automata: A simple annealed approximation. *Europhys Lett* 1: 45–49.
- [46] Shmulevich I, Kauffman SA, Aldana M (2005) Eukaryotic cells are dynamically ordered or critical but not chaotic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13439–13444.
- [47] Gupta S, Bisht SS, Kukreti R, Jain S, Brahmachari SK (2007) Boolean network analysis of a neurotransmitter signaling pathway. *Journal of Theoretical Biology* 244: 463 - 469.
- [48] Wang D, King SM, Quill TA, Doolittle LK, Garbers DL (2003) A new sperm-specific na^+/h^+ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol* 5: 1117–22.
- [49] Liu J, Xia J, Cho KH, Clapham DE, Ren D (2007) Catsperbeta, a novel transmembrane protein in the catsper channel complex. *J Biol Chem* 282: 18945–18952.
- [50] de Visser JAGM, Hermisson J, Wagner GP, Meyers LA, Bagheri-Chaichian H, et al. (2003) PERSPECTIVE: EVOLUTION AND DETECTION OF GENETIC ROBUSTNESS. *Evolution* 57: 1959–1972.
- [51] Edelman GM, Gally JA (2001) Degeneracy and complexity in biological systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 13763–13768.
- [52] Daniels BC, Chen YJ, Sethna JP, Gutenkunst RN, Myers CR (2008) Sloppiness, robustness, and evolvability in systems biology. *Curr Opin Biotechnol* 19: 389–395.
- [53] Kerszberg M (2004) Noise, delays, robustness, canalization and all that. *Curr Opin Genet Dev* 14: 440–445.

- [54] Kirschner M, Gerhart J (1998) Evolvability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8420–8427.
- [55] Kitano H (2004) Biological robustness. *Nat Rev Genet* 5: 826–837.
- [56] Kitano H (2007) The theory of biological robustness and its implication in cancer. *Ernst Schering Res Found Workshop* : 69–88.
- [57] Kaupp UB, Solzin J, Hildebrand E, Brown JE, Helbig A, et al. (2003) The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nat Cell Biol* 5: 109–17.