



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de la Red de Regulación Genética implicada en la
polaridad Abaxial-Adaxial en primordios de hoja de
Arabidopsis thaliana (Brassicaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

PRESENTA:

Mariana Yuste Ramírez

TUTORA:

Dra. Alma Amparo Piñeyro Nelson

CO-TUTOR:

Dr. Eugenio Martín Azpeitia Espinosa

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2022





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.

Índice

| | |
|--|----|
| 0. Resumen | |
| 1. Introducción | 5 |
| 1.1. Morfología foliar..... | 5 |
| 1.1.1. Las hojas, órganos principales de las plantas vasculares..... | 5 |
| 1.1.2. Anatomía y desarrollo de la hoja como órgano dorsiventral..... | 6 |
| 1.2. Genética foliar..... | 8 |
| 1.2.1. Principales agentes genéticos responsables de la polaridad aB-aD..... | 8 |
| 1.2.2. Señal de Sussex: conexión entre el meristemo y la hoja..... | 11 |
| 1.3. Modelaje matemático..... | 13 |
| 1.3.1. Redes de Regulación Genética..... | 14 |
| 1.3.2. Ventajas del uso de modelos matemático-computacionales..... | 16 |
| 2. Objetivos | 17 |
| 3. Métodos | 18 |
| 3.1. Formalismos de las redes booleanas..... | 18 |
| 3.2. Tipos de regulaciones..... | 21 |
| 3.3. Formación y reducción de la RRG..... | 22 |
| 3.4. Análisis manual de la red..... | 23 |
| 3.5. Análisis radial empleando Griffin..... | 25 |
| 3.6. Simulación de mutantes..... | 25 |
| 3.7. Análisis asíncrono..... | 26 |
| 3.8. Análisis de robustez..... | 27 |
| 4. Resultados | 28 |
| 4.1. Definición de la Red General..... | 28 |
| 4.2. Reducción de la Red General y creación de una Red Mínima..... | 31 |
| 4.2.1. Creación de una Red Reducida..... | 31 |
| 4.2.2. Creación de una Red Mínima..... | 33 |
| 4.3. Definición de los atractores esperados..... | 35 |
| 4.4. Análisis manual de la red..... | 36 |
| 4.5. Análisis empleando Griffin..... | 36 |
| 4.6. Validación de los modelos por análisis de mutantes..... | 39 |
| 4.6.1. Mutantes a simular y definición de las reglas de cumplimiento..... | 39 |
| 4.6.2. Simulación de mutantes con actualización síncrona y asíncrona..... | 42 |
| 4.7. Análisis de robustez..... | 44 |
| 4.8. Reincorporación de auxina..... | 47 |
| 5. Discusión | 47 |
| 5.1. Modelaje matemático..... | 47 |

| | |
|--|----|
| 5.1.1. Modelos congruentes con la información experimental disponible..... | 47 |
| 5.1.2. Sincronía o Asincronía en modelos booleanos..... | 49 |
| 5.1.3. Modelado discreto de sistemas continuos..... | 50 |
| 5.2. Robustez en los modelos..... | 52 |
| 5.2.1. Baja robustez en los modelos analizados..... | 52 |
| 5.2.2. Regulaciones no-funcionales en las redes aleatorias..... | 54 |
| 5.2.3. Robustez y evolvabilidad en la polaridad aB-aD..... | 56 |
| 5.3. Implicaciones biológicas del modelo..... | 58 |
| 5.3.1. Regulaciones hipotéticas..... | 58 |
| 5.3.2. Casos particulares: YAB1 y ARF3..... | 60 |
| 5.3.3. Simulaciones de mutantes que no satisfacen la información experimental... | 63 |
| 5.3.4. Señal de Sussex..... | 64 |
| 5.3.5. Limitaciones del modelo..... | 65 |
| 5.4. Perspectivas a futuro..... | 66 |
| 6. Conclusiones | 67 |
| 7. Referencias | 69 |
| Anexo | 85 |

Resumen

Las hojas megáfilas, presentes en la mayoría de las plantas vasculares, muestran en el eje dorsoventral una polaridad abaxial-adaxial, la cual típicamente posee una diferencia de tejidos en cada lado permitiendo una mayor eficiencia fotosintética. Esta diferencia se genera desde el inicio del primordio foliar en parte a una red integrada por genes, microRNAs y hormonas. En este trabajo se construyó la Red de Regulación Genética de la polaridad abaxial-adaxial en el primordio de hoja de *Arabidopsis thaliana* a partir de datos experimentales previamente publicados. Se buscaron las redes booleanas que satisfacen las regulaciones de la red usando la herramienta *Griffin* y se llevaron a cabo simulaciones de mutantes y análisis de robustez en las redes booleanas encontradas. La red general obtenida consistió de 21 nodos y 47 regulaciones de activación e inhibición, de las cuales 22 tienen información experimental suficiente para confirmar una regulación física directa. Después de una reducción de la red se obtuvo una Red Mínima de 6 nodos con la que se encontraron 1905 redes booleanas que satisfacen sus regulaciones y generan únicamente a los atractores abaxial y adaxial. Dentro de estas redes, son 39 las que nos permiten entender a la mayor cantidad de mutantes conocidas y dos de ellas obtienen la mayor robustez a perturbaciones. Estas dos redes comparten las mismas regulaciones hipotéticas, las cuales habría que ahondar en estudios experimentales para confirmar su existencia. A pesar de ello, la robustez obtenida fue más baja de lo esperado para la polaridad abaxial-adaxial, posiblemente por la reducción que se le hizo a la red la cual eliminó nodos redundantes. Los genes y regulaciones de la Red Mínima son suficientes para explicar la generación de polaridad abaxial-adaxial en hoja de *A. thaliana* pero no para explicar la robustez vista en el sistema biológico.

Palabras clave: Polaridad abaxial-adaxial; primordio foliar; *Arabidopsis thaliana*; Modelado de redes booleanas

1. Introducción

1.1. Morfología foliar

1.1.1. Las hojas, órganos principales de las plantas vasculares

Las hojas megáfilas o verdaderas son el principal interés de ésta tesis. Las hojas tipo megáfilas, que de ahora en adelante llamaré únicamente hojas, son órganos laminares con una venación ramificada encargadas de funciones esenciales de las plantas como son la fotosíntesis, la respiración y la transpiración (Cronk, 2009; Gifford & Foster, 1989). El primer registro fósil de una planta con hojas se encuentra en el Devónico temprano, con *Eophyllophyton bellum*, hace 410 millones de años. Para el Devónico tardío las hojas ya se encontraban de forma abundante en las floras terrestres fosilizadas hoy en día (Beerling *et al.*, 2001). Actualmente las megáfilas son el tipo de hoja que todas las plantas vasculares, a excepción del clado *Lycopodiophyta*, poseen como estructura anatómica básica (Simpson, 2010).

La importancia de las hojas para las plantas se evidencia en el hecho de ser un órgano que ha prevalecido como estructura principal en las plantas vasculares desde su aparición, además de haberse originado de manera independiente en los dos clados principales de las plantas vasculares: *Polypodiophyta* y *Spermatophyta* (Piazza *et al.*, 2005).

La omnipresencia de la hoja como estructura principal de la gran mayoría de las plantas llevó a Goethe (1790) a formular la hoy llamada Teoría Foliar, donde afirma que “todo es hoja”, es decir, todo órgano aéreo de una planta es en realidad una hoja modificada. En esta teoría, la hoja es el órgano principal de las plantas de la que derivan todos los demás órganos laterales aéreos, incluyendo los órganos florales. Un ejemplo es el carpelo de las angiospermas el cual,

según la hipótesis más aceptada, es una megaesporófila (una hoja modificada que posee megaesporangios) que se dobló sobre sí misma (Simpson, 2010).

1.1.2. Anatomía y desarrollo de la hoja como órgano dorsiventral (polaridad abaxial-adaxial)

En el caso de las plantas vasculares, una hoja típica es plana y se conforma de tres ejes principales: próximo-distal, centro-lateral y dorso-ventral (también llamado abaxial-adaxial, aB-aD), resultado de un crecimiento diferenciado (Bowman *et al.*, 2002; Simpson, 2010). Al igual que el resto de los órganos laterales en la planta adulta, la hoja se origina del tejido del meristemo, región caracterizada por una división celular continua e indefinida (Evert, 2006). La formación de la hoja comienza con la diferenciación de algunas células del Meristemo Apical del Tallo (SAM, por sus siglas en inglés), formando una protuberancia llamada primordio foliar.

Durante su desarrollo, la parte superior del primordio se encuentra adyacente al meristemo y formará el lado adaxial (aD) de la hoja, mientras que la parte inferior del primordio producirá el lado abaxial (aB) (ver Dkhar & Pareek, 2014 para una revisión de la determinación de la forma de una hoja y Kuhlemeier & Timmermans, 2016 para una revisión exclusiva de la determinación de polaridad aB-aD).

Ambos lados (aD y aB) suelen diferenciarse a lo largo del desarrollo, adquiriendo distintos tejidos celulares (Figura 1): en eudicotiledóneas el lado aD se identifica por un mesófilo en empalizada donde hay pocos y pequeños espacios intercelulares y una epidermis con mayor número de tricomas. En contraste, el lado aB tiene un mesófilo con tejido esponjoso caracterizado por más y mayores espacios intercelulares y una epidermis con más estomas (Simpson, 2010).

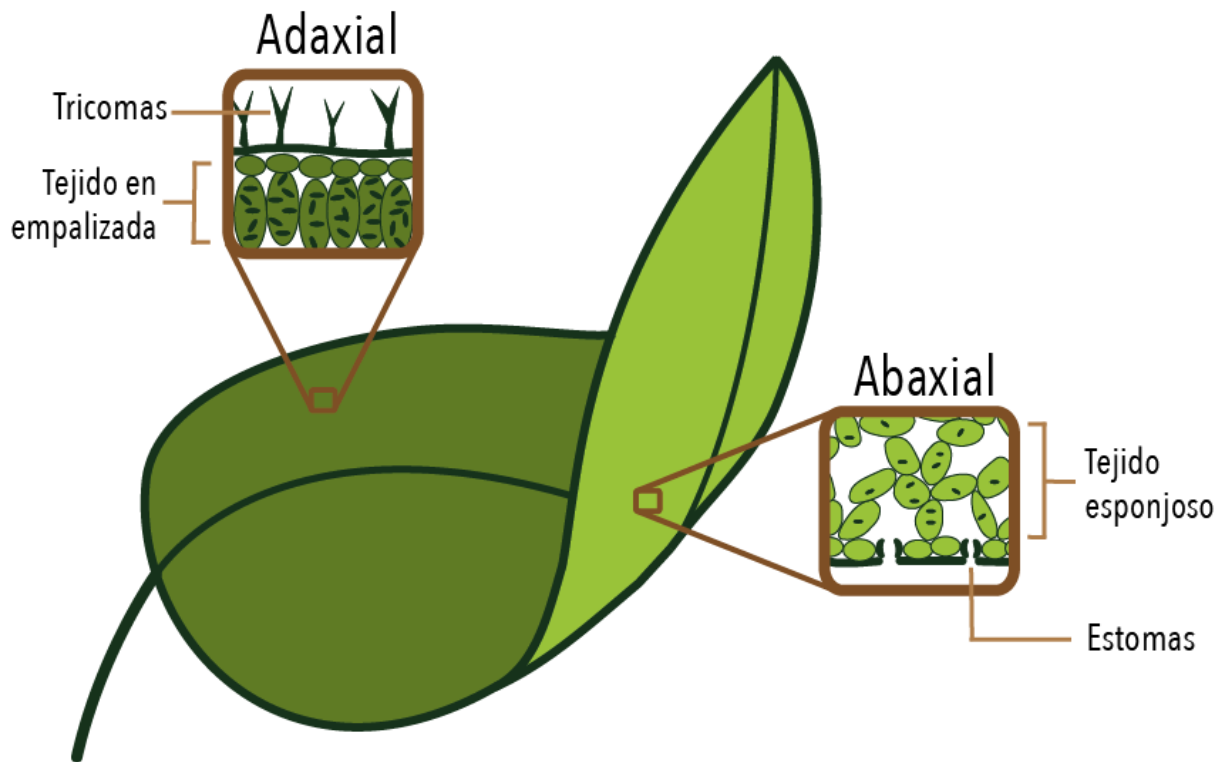


Figura 1. Representación de la polaridad aB-aD en hoja. Cada lado tiene diferentes tipos de tejidos que en conjunto promueven una mayor eficiencia fotosintética.

En las hojas, dichas diferencias estructurales permiten una mayor captación de luz y menor evapotranspiración, promoviendo que éstas sean los principales órganos fotosintéticos. De manera notable, la simetría aB-aD también se encuentra en otros órganos laterales de las plantas, incluyendo órganos florales como los pétalos y sépalos (Eshed *et al.*, 2001). Incluso, si nos basamos en la Teoría Foliar, podríamos afirmar que todos los órganos laterales florales de una planta (sépalos, pétalos, estambres y carpelos) poseen polaridad aB-aD, aunque algunos desarrollen el lado aD de manera interna y el aB rodeándolo, como en el caso de los carpelos, o que incluso desarrollen sólo uno de los lados y se formen como órganos cilíndricos como en el caso de algunas hojas mutadas (Eshed *et al.*, 1999).

Una vez que se formó la diferenciación dorsiventral en el primordio foliar, ésta promoverá un crecimiento lateral (Qi *et al.*, 2017), creando una hoja plana con simetría bilateral y dorsiventral. Las hojas con simetría dorsiventral están presentes en la mayoría de las angiospermas, con algunas excepciones de plantas con hojas unifaciales o con cambios en el arreglo de ambos lados (Tsukaya, 2014; Fukushima & Hasebe, 2014). Esta dominancia de la hoja bifacial indica que la polaridad aB-aD es una característica altamente estable que se ha mantenido a lo largo de la evolución de las angiospermas, probablemente por la eficiencia fotosintética que tiene una hoja dorsiventral al presentar una alta superficie para la asimilación de la luz, lo que le permite tener un alto ratio de superficie contra volumen y una menor pérdida de agua al mantener mayor densidad de estomas en el lado aB (Kuhlemeier & Timmermans, 2016).

1.2. Genética foliar

En este apartado se hará una breve síntesis de la información referente a los genes, RNAs y hormonas asociados al desarrollo de la polaridad aB-aD en plantas, enfocándose específicamente en los estudios realizados en hojas de la especie modelo *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). Estos factores serán los que conformen la red de regulación genética que se modelará en este trabajo.

1.2.1. Principales agentes genéticos responsables de la polaridad aB-aD

Desde hace años se han estudiado los factores genéticos relacionados con la polaridad aB-aD en algunas especies de plantas, con un énfasis particular en las especies modelo *A. thaliana*, *Zea mays*, *Oryza sativa* y *Antirrhinum majus* (Husbands *et al.*, 2009). En el caso de *A. thaliana*, los genes que se ha sugerido están asociados al desarrollo de la polaridad aB-aD son los pertenecientes a las familias KANADI (específicamente *KAN1*, *KAN2*, *KAN3* y *KAN4*), YABBY (*YAB1*, *YAB3* y *YAB5*), HD-ZipIII (*PHB*, *PHV* y *REV*), AUXIN RESPONSE

FACTORS (*ARF3* y *ARF4*) y ASYMMETRIC LEAVES (*AS1* y *AS2*) (Eshed *et al.*, 2001; Siegfried *et al.*, 1999; Emery *et al.*, 2003; Pekker *et al.*, 2005; Byrne *et al.*, 2000; Ori *et al.*, 2000). Todos ellos son factores de transcripción (FT) y en casi ninguno se ha demostrado que haya movilidad intercelular, por lo que suponemos que su sitio de expresión es también el sitio donde actúan (Husbands *et al.*, 2009). La única excepción es el gen *REV*, cuyo mRNA parece tener movilidad intercelular (Thieme *et al.*, 2015). Este conjunto de genes se puede dividir en dos grupos principales dependiendo de si codifican para promover el fenotipo de células aB (los *KANADI*, *YABBY* y *ARF*) o de células aD (*HD-ZipIII* y *AS*) y se ha confirmado que entre estos dos grupos existen fuertes interacciones represivas, además de regular en dirección opuesta a un mismo conjunto de genes blanco, lo que favorece el mantenimiento de una frontera bien delimitada entre las dos poblaciones celulares y una regulación robusta de ambos fenotipos (Qi *et al.*, 2017, Husbands *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2012). Se han encontrado homólogos de casi todos los genes arriba mencionados en clados de plantas con características basales, incluso en plantas sin semilla (Sarojam *et al.*, 2010) y, aunque en todas las especies de angiospermas estudiadas mantienen un papel importante para la generación de la polaridad aB-aD, su contribución y expresión en cada órgano puede tener diferencias interespecíficas e incluso más importancia en ciertos órganos que en otros para la misma especie (Kuhlemeier & Timmermans, 2016; Yamada *et al.*, 2011; Sablowski *et al.*, 2015). Por ejemplo, en *A. thaliana* todos los miembros de la familia *YABBY* son funcionalmente redundantes y promueven abaxialización en las células que los expresan, pero el nivel de redundancia cambia dependiendo del órgano en el que se encuentren: si se hacen mutaciones de pérdida de función en el gen *YAB1* se generan defectos considerables en órganos florales mientras que en hojas los defectos son menores al haber mayor contribución del resto de genes de la familia (Sarojam *et al.*, 2010). Además, los genes de esta familia también muestran diferentes niveles de expresión en un mismo órgano (Sarojam *et al.*, 2010) e incluso, a pesar de observarse un papel en el crecimiento

laminar en todas las especies donde se han estudiado, los genes YABBY tienen patrones de expresión distintos entre plantas mono- y eudicotiledóneas, llegando a cambiar de una expresión restringida a células aD o bifacial en especies de la familia Poaceae (como *Z. mays*), a una expresión meramente aB en especies eudicotiledóneas como *A. thaliana* (Yamada *et al.*, 2011). Otro ejemplo lo encontramos en el gen *ASI* y sus ortólogos, cuyas mutaciones de pérdida de función no muestran un cambio fenotípico significativo en la polaridad de *A. thaliana* y *Z. mays*, pero en *A. majus*, tabaco y tomate presentan fenotipos con defectos marcados en la polaridad aB-aD (Kuhlemeier & Timmermans, 2016).

Además de estos genes importantes para explicar la polaridad aB-aD en hoja, se han ido encontrando otros agentes con un papel en el desarrollo de la polaridad en órganos laterales, habiendo hoy en día un conjunto grande de genes (FT u otros tipos), RNAs regulatorios y hormonas conocidos por estar implicados en el desarrollo de esta propiedad (Braybrook & Kuhlemeier, 2010). Por otro lado, al haber una regulación de la polaridad en niveles transcripcionales y post-transcripcionales se incrementa la robustez de esta característica (Qi *et al.*, 2014). Además, es importante no perder de vista que la polaridad aB-aD es una característica que depende no sólo de factores genéticos, también de factores ambientales (como respuesta a sombra) o mecánicos (como la elasticidad de la pared celular (Bou-Torrent *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2017).

A diferencia de los FT nombrados anteriormente (*KAN1*, *KAN2*, *KAN3*, *PHB*, *PHV*, *REV*, *ARF3*, *ARF4*, *ASI* y *AS2*), algunos agentes con actividad de regulación post-transcripcional sí tienen movilidad intercelular, como son los miRNA165, miRNA166 y tasiR-ARF. Esta característica permite generar un gradiente de expresión a través del órgano en desarrollo, con una acumulación predominante en la zona donde se producen (aB para los miRNA165/166, aD para tasiR-ARF) (Chitwood *et al.*, 2009; Husbands *et al.*, 2015). Recientemente se ha propuesto que estos reguladores post-transcripcionales son de los principales causantes de la expresión

diferenciada de los genes polares, pues los genes *ARF* (*ARF3* y *ARF4*) y *HD-ZipIII* (*PHB*, *PHV* y *REV*) son silenciados de manera directa por tasiR-ARF y miR165/166, respectivamente (Allen *et al.*, 2005; Emery *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005).

La presencia de miRNAs en la regulación de la dorsiventralidad indica que genes de la familia ARGONAUTE (como *AGO1* y *AGO10*) también están implicados: para poder silenciar al mRNA blanco, los miRNA deben unirse a una proteína AGO y formar un complejo RISC (RNA-Induced Silencing Complex), el cual se une a un mRNA mediante la guía del miRNA y genera su silenciamiento (Kidner & Martienssen, 2005).

Al ser los primordios foliares la etapa de la hoja donde varios de estos factores polares conviven, para después expresarse únicamente en uno u otro lado de la hoja, en la vasculatura o incluso apagar su expresión por completo, los datos experimentales reseñados arriba sugieren que la etapa genética importante para la formación de la polaridad aB-aD es durante los estados tempranos de diferenciación del primordio foliar (Iwakawa *et al.*, 2007).

Dada la diversidad de patrones de expresión y posible diversificación funcional de los genes implicados en la polaridad aB-aD en diferentes linajes de angiospermas durante la diferenciación de tejidos de la hoja y la expansión celular, este trabajo se limitará a estudiar los elementos genéticos que generan el establecimiento de la polaridad aB-aD en las primeras etapas de diferenciación del primordio de hoja a partir del SAM, con base en la información documentada en *A. thaliana*.

1.2.2. Señal de Sussex: conexión entre el meristemo y la hoja

Como se explicó arriba, la zona superior del primordio foliar que formará el lado aD de la hoja se encuentra adyacente al SAM, mientras que las células del lado aB no tienen un contacto directo con las células del SAM (Figura 2). Esto ha generado la hipótesis de una señal proveniente del SAM que llega a los primordios de órganos laterales e induce su polaridad.

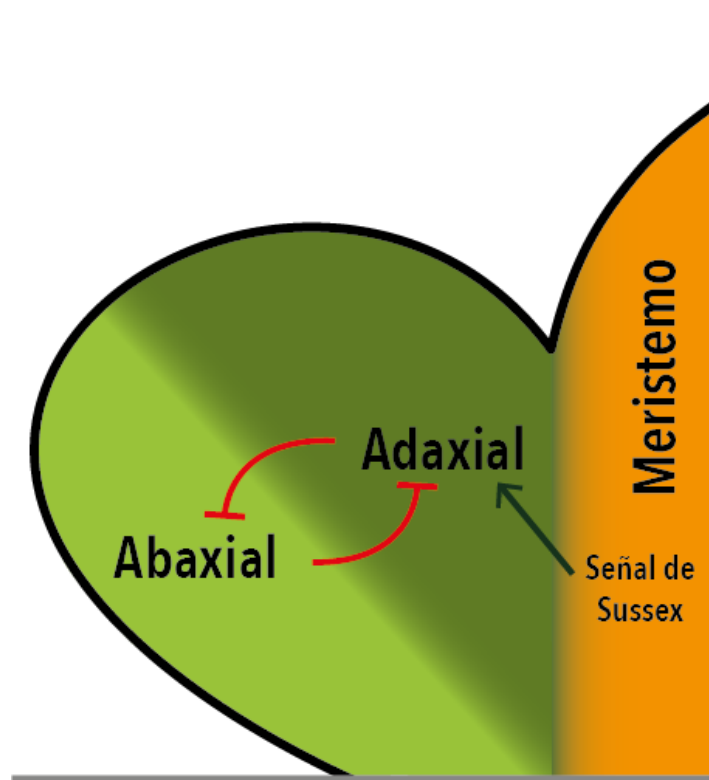


Figura 2. Primordio foliar con polaridad aB-aD diferenciada. El lado aDaxial se encuentra adyacente al meristemo y recibe la Señal de Sussex, mientras que el lado aBaxial no tiene contacto con el meristemo. Ambos lados se inhiben mutuamente.

A partir de esta hipótesis se han hecho experimentos donde, al separar el primordio incipiente del meristemo se genera un primordio radializado con células tipo aB rodeándolo, e incluso se llega al mismo resultado si únicamente se hacen incisiones que separen al primordio lateral del SAM, aún cuando éste se mantenga unido al resto de la planta (Sussex, 1951). Estos experimentos, originalmente hechos en tallos de papa (*Solanum tuberosum*), han sido recientemente reproducidos en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y con nuevas técnicas microquirúrgicas usando láser infrarrojo, obteniendo los mismos resultados que los experimentos realizados por Sussex en 1951 (Reinhardt *et al.*, 2005).

Se propone que las células que se encuentran adyacentes al meristemo reciben esta señal, llamada señal de Sussex, y que esto activará a los factores promotores del fenotipo aD, como son los genes de la familia HD-ZipIII. Estos a su vez inhiben a los factores promotores del dominio aB, como los YABBY y KANADI, restringiendo su expresión a la zona del primordio que no está en contacto con el meristemo. Por lo tanto, el fenotipo por defecto que se genera en ausencia de esta señal es el aB (Bowman *et al.*, 2002).

Esta señal además parece ser constante durante cierta ventana del desarrollo, pero requerida únicamente al inicio de la diferenciación del primordio de hoja, pues al hacerse incisiones en etapas más tardías no se generan defectos en el establecimiento de la polaridad aB-aD (Kuhlemeier & Timmermans, 2016).

Ya que casi ninguno de los factores de transcripción polares, con excepción de *REV*, tienen movilidad intercelular (Husbands *et al.*, 2009; Thieme *et al.*, 2015), una molécula candidata para la señal de Sussex es la fitohormona Auxina, la cual es sintetizada principalmente en la punta del tallo para después ser transportada de regreso al meristemo, generando una menor concentración de la hormona en el lado aD y mayor en el aB (Heisler *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2014). Al tener un papel tan importante en la determinación de la dorsiventralidad, algunos genes implicados en el meristemo y su mantenimiento, como los del tipo KNOX, podrían también formar parte de la generación de polaridad en órganos laterales. El factor de transcripción SHOOT MERISTEMLESS (*STM*) podría ser uno de los genes implicados en ambos fenómenos, siendo que su expresión ectópica resulta en la formación de meristemos en la superficie aD de órganos laterales (Hay *et al.*, 2002).

1.3. Modelaje matemático

Gracias a los experimentos de alto rendimiento de secuenciación de diferentes biomoléculas como DNA y RNA (cDNA), estos últimos años se ha recopilado una gran cantidad de

información sobre distintas moléculas en plantas incluyendo genes, proteínas, microRNAs, hormonas y las posibles interacciones entre ellas. Incluso se han logrado secuenciar genomas completos de ciertas especies, incluyendo a *A. thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Sin embargo, esta creciente cantidad de datos disponibles nos otorga información escasa sobre el funcionamiento de los organismos (La Rota *et al.*, 2011), demostrando que dicha información no es suficiente por sí sola y se requieren métodos de integración y obtención de datos para comprender el salto de una secuencia genética a un organismo vivo.

En la literatura actual de la genética molecular hay abundantes representaciones esquemáticas de posibles interacciones entre distintos genes, en el caso de la polaridad aB-aD se pueden encontrar algunos ejemplos en los trabajos de Bowman *et al.* (2002), Chitwood *et al.* (2007), Yamaguchi *et al.* (2012) y Rodriguez *et al.* (2013). A pesar de ser muy explicativas, las representaciones esquemáticas son meramente descriptivas, algunas veces detallando únicamente vías bioquímicas donde los genes interaccionan de manera jerárquica y donde el gen que influye en el estado de otro lo hace por una única vía. Actualmente sabemos que las rutas bioquímicas genéticas están acopladas a redes no jerárquicas que contienen bucles de retroalimentación donde un mismo gen puede afectar y ser afectado de manera cíclica, y donde es posible que un gen influya sobre otro a través de diferentes vías (Álvarez-Buylla *et al.*, 2008; Azpeitia *et al.*, 2011). Una herramienta que puede integrar esta información y pasar de un estudio descriptivo a un análisis predictivo del fenómeno son los modelos matemáticos.

1.3.1. Redes de Regulación Genética

Entre los diferentes tipos de modelado matemático, los modelos de redes son una herramienta integrativa de los elementos e interacciones que conforman a un sistema biológico. En particular, las Redes de Regulación Genética (RRG) son un tipo de modelaje de redes conformadas por nodos, que representan genes, mRNAs, proteínas y otras moléculas que se

vinculan entre sí por aristas de activación o inhibición (que de ahora en adelante llamaré regulaciones), representando transcripciones, traducciones y regulaciones transcripcionales.

Dado que los elementos de una RRG son moléculas cuya concentración puede cambiar a lo largo del tiempo dependiendo de sus interacciones, es importante hacer un modelo dinámico del proceso, para lo cual, a grandes rasgos, existen dos aproximaciones: hacer un modelo continuo o uno discreto. Los modelos continuos están descritos usualmente con Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (ODEs por sus siglas en inglés), donde se formulan ecuaciones con variables y tiempo continuos, buscando estimar parámetros constantes en el tiempo para generar un modelo cuyos resultados coincidan con los documentados experimentalmente (ver Dominguez-Huttinger *et al.*, 2013 como ejemplo de un modelo continuo usando ODEs). Este tipo de modelaje genera resultados con un alto nivel de detalle y tiene la capacidad de analizar la dependencia del sistema hacia los parámetros. Sin embargo, para poder indagar dichos parámetros se requieren datos experimentales específicos sobre las relaciones entre los elementos, los cuales no siempre están disponibles. Además, pueden ser difíciles de estudiar, requiriendo técnicas de análisis numérico, optimización de parámetros, entre otras cosas. Es por ello que estos modelos estudian pocos elementos moleculares.

Los modelos discretos representan una alternativa a los obstáculos encontrados en las ODEs al no requerir información tan específica sobre los componentes del sistema y poder soportar la adición de más elementos. Pero, por lo mismo, no permiten capturar detalles del sistema biológico ni se pueden observar muchos detalles de las transiciones que ocurren en el paso de un estado inicial a uno final en el sistema (Saadatpour *et al.*, 2013). Aunque los modelos discretos no permiten agregar información detallada sobre la cinética de la activación genética, sí nos permiten explorar la actividad en conjunto de la red de genes involucrados de manera dinámica, facilitando la identificación de contradicciones o huecos en los datos experimentales que de otra manera se podrían escapar fácilmente (Álvarez-Buylla *et al.*, 2007). Con estos

modelos se ha propuesto que la parte genética de la determinación del tipo celular depende principalmente de los aspectos globales de la arquitectura de la red de genes más que de los valores precisos de los parámetros para las funciones de activación genética o degradación proteica (Álvarez-Buylla *et al.*, 2007).

Un tipo de modelaje discreto de una RRG son las Redes Booleanas, donde los nodos pueden tomar únicamente dos valores: 1 ó 0, que representan que dicha molécula se encuentra activa o arriba de cierto umbral (1), o inactiva o abajo de cierto umbral (0), respectivamente (por ejemplo: en el caso de un gen, 1 representaría que el gen se está expresando y 0 que no se expresa). El valor de cada nodo en el tiempo $t+1$ se actualiza a partir del valor que tengan los nodos que lo regulan en el tiempo actual t . A través de la actualización de los valores de todos los nodos de la red se llegará a un estado (o conjunto de estados) estacionario de la red llamado atractor. Se ha propuesto que los valores de los nodos en un atractor representan su expresión en la célula, por lo que cada atractor puede ser interpretado como un tipo celular (Kauffman, 1969).

1.3.2. Ventajas del uso de modelos matemático-computacionales

Como se dijo arriba, no existe una relación directa entre el aumento en la cantidad de información molecular que se ha generado en los últimos años y la comprensión que tenemos respecto al funcionamiento de los seres vivos. En los modelos matemáticos-computacionales se ha encontrado una herramienta que integra la información disponible y nos ayuda a entender e incluso predecir nuevas regulaciones en el sistema de estudio. Un modelo computacional permite hacer experimentos con pocos requerimientos de forma repetible y controlada y los resultados obtenidos ayudan a generar hipótesis que se pueden probar en los sistemas reales y así facilitar una búsqueda dirigida de la información. Aunque ya se han hecho modelajes del desarrollo de la polaridad en órganos laterales (ver La Rota *et al.*, 2011 para un modelo de red

molecular de la polaridad en primordios de sépalos de *A. thaliana*), no se encontró en la literatura disponible un intento de modelaje del establecimiento de polaridad en primordios de hoja. Es por ello que en este trabajo se pretende modelar la RRG de la polaridad aB-aD en las primeras etapas de diferenciación del primordio de hoja con base en la información documentada para *A. thaliana*, usando modelos de redes booleanas como herramienta para explorar la dinámica de la red.

2. Objetivos

Objetivo General

Construir y analizar, usando el formalismo booleano, la Red de Regulación Genética de la polaridad abaxial-adaxial en el primordio de hojas de *Arabidopsis thaliana* a partir de datos experimentales previamente publicados.

Objetivos particulares

- Definir los genes y las relaciones de regulación asociadas al desarrollo de la polaridad abaxial-adaxial en primordio de hojas a partir de una revisión exhaustiva de la literatura.
- Buscar las redes booleanas que satisfagan las regulaciones de la red y generen los atractores de polaridad aB y aD.
- Encontrar las redes booleanas que nos permitan entender mejor el sistema por medio de simulaciones de mutantes y análisis de robustez, contrastando sus resultados con los documentados experimentalmente.
- Averiguar si los nodos y regulaciones de la red son suficientes para explicar los aspectos genéticos del sistema biológico.

3. Métodos

3.1. Formalismos de las redes booleanas

En una red booleana los nodos, que representan las variables de sistema (i.e., genes, proteínas, hormonas, etc.), pueden tomar únicamente dos valores: 1 ó 0. Al ser modelos dinámicos, el valor de cada nodo en una red booleana cambia con respecto al tiempo dependiendo del valor de los nodos que lo regulan. De esta forma, el valor del nodo al tiempo $t + 1$ se define con la función

$$x_i(t + 1) = f_i (x_1(t), x_2(t), x_3(t), \dots , x_n(t))$$

donde $x_1(t), x_2(t), x_3(t), \dots , x_n(t)$ son los reguladores del nodo x_i y f_i es la función (expresión booleana) que representa a la regla lógica del nodo x_i , en la cual se integra la información de las regulaciones hacia ese nodo. Las reglas lógicas también pueden representarse en una tabla, llamada tabla de verdad, conformada por los valores de entrada de los reguladores del nodo x_i en el tiempo t y los valores resultantes de dicho nodo en el tiempo $t + 1$. En el Cuadro 1 se muestran las 16 posibles reglas lógicas, representadas en tabla de verdad y expresión booleana, de un nodo con dos reguladores. Dado que cada nodo puede tener dos valores, existen 2^N estados posibles para una red con N nodos. Al conjunto de todos los estados posibles de una red se le denomina espacio de estados. Los estados se representan como un vector de unos y ceros $X = (x_1, x_2, x_3, \dots , x_n)$ que contiene los valores que cada uno de los nodos tienen en dicho estado. Las redes tienen diferentes tipos de estados. Aquí nos enfocaremos en los estados atractores (cíclicos y de punto fijo) y los estados transitorios. Un atractor se define como un estado (atractor de punto fijo) o conjunto de dos o más estados

(atractor cíclico) que, al ser autosostenidos, una vez que la red llega a ellos se mantendrá ahí. Mientras que en los atractores de punto fijo la red se mantiene en el único estado del atractor, en los atractores cíclicos ésta se mantiene oscilando en los estados del atractor de forma indefinida. Los estados transitorios son aquellos que la red recorre antes de alcanzar un atractor. Finalmente, una trayectoria es el camino de estados que sigue la red a lo largo del tiempo.

Teniendo los nodos y reglas lógicas de una red booleana se puede seguir la trayectoria, a partir de cada uno de los estados, dentro del espacio de estados de la red a lo largo del tiempo hasta llegar a un atractor. Todos los estados que lleven a un atractor son su cuenca de atracción.

Se ha propuesto que la expresión que los genes o moléculas tienen en una célula de forma estable son atractores en una RRG, por lo que cada atractor de una RRG booleana puede ser interpretado como un tipo celular del sistema bajo estudio (Kauffman, 1969). Trabajos recientes de modelos basados en información experimental han podido confirmar dicha suposición (por ejemplo: Espinosa-Soto *et al.*, 2004; Ortiz-Gutiérrez *et al.*, 2015; García-Gómez *et al.*, 2017).

Las redes booleanas se pueden categorizar en redes síncronas o asíncronas según la forma en la que se actualicen los valores de sus nodos. En una red síncrona todos los nodos se actualizan simultáneamente, mientras que en una red asíncrona no todos los nodos actualizan su estado al mismo tiempo (Thomas & D'Ari, 1990). Todas las redes modeladas en este trabajo se harán siguiendo una actualización síncrona, con excepción de algunos casos donde se hará explícito el uso de una actualización asíncrona.

Cuadro 1. Reglas lógicas posibles con dos reguladores. Se muestran las 16 posibles reglas lógicas de X para todos los posibles estados de sus reguladores Y y Z. Estas reglas lógicas se encuentran representadas en tablas de verdad y su respectiva expresión booleana. En las primeras dos filas de las tablas de verdad se encuentran los posibles estados iniciales de los reguladores Y y Z, las filas siguientes muestran los posibles resultados que puede tener X y a su derecha la expresión booleana para dicha regla lógica usando los operadores OR ($|$), AND ($\&$) y NOT (\neg). Para cada regla lógica se muestra el tipo de regulación que cada nodo produce, tanto si es de signo positivo (+), negativo (-) o ambos (+ y -), como si es una regulación funcional (F) o no-funcional (N).

| Tablas de verdad | | | | | Expresión booleana | Tipo de regulaciones | | | | no. regla lógica |
|------------------|---|---|---|---|---------------------------------|----------------------|-------|---------------|---|------------------|
| Y (t) | 0 | 0 | 1 | 1 | | Signo | | Funcionalidad | | |
| Z (t) | 0 | 1 | 0 | 1 | | Y | Z | Y | Z | |
| X (t+1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | N | N | 1 |
| | 0 | 0 | 0 | 1 | Y & Z | + | + | F | F | 2 |
| | 0 | 0 | 1 | 0 | Y & \neg Z | + | - | F | F | 3 |
| | 0 | 0 | 1 | 1 | Y | + | | F | N | 4 |
| | 0 | 1 | 0 | 0 | \neg Y & Z | - | + | F | F | 5 |
| | 0 | 1 | 0 | 1 | Z | | + | N | F | 6 |
| | 0 | 1 | 1 | 0 | $(\neg Y \& Z) (Y \& \neg Z)$ | + y - | + y - | N | N | 7 |
| | 0 | 1 | 1 | 1 | Y Z | + | + | F | F | 8 |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | $\neg Y \& \neg Z$ | - | - | F | F | 9 |
| | 1 | 0 | 0 | 1 | $(\neg Y \& \neg Z) (Y \& Z)$ | + y - | + y - | N | N | 10 |
| | 1 | 0 | 1 | 0 | $\neg Z$ | | - | N | F | 11 |
| | 1 | 0 | 1 | 1 | Y $\neg Z$ | + | - | F | F | 12 |
| | 1 | 1 | 0 | 0 | $\neg Y$ | - | | F | N | 13 |
| | 1 | 1 | 0 | 1 | $\neg Y Z$ | - | + | F | F | 14 |
| | 1 | 1 | 1 | 0 | $\neg Y \neg Z$ | - | - | F | F | 15 |
| | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | N | N | 16 |

3.2. Tipos de regulaciones

Regulación positiva y negativa

En una RRG las regulaciones son aristas directas con signo positivo o negativo dependiendo de si el regulador promueve o inhibe, respectivamente, la expresión del gen blanco. Para definir el papel que tiene cada regulador se empleó la regla usada por Rosenblueth y colaboradores (2014): Un nodo X regula positivamente a un nodo Y si existen valores constantes de todos los nodos distintos a X tal que el valor de Y es el mismo que el valor de X para ambos valores de X (si X es 1, Y es 1; si X es 0, Y es 0). Por el contrario, un nodo X regula negativamente a un nodo Y si existen valores constantes de todos los nodos distintos a X tal que el valor de Y es el complemento del valor de X para ambos valores de X (si X es 1, Y es 0; si X es 0, Y es 1). En el Cuadro 1 se muestran ambos tipos de regulaciones. Si una regulación no tiene suficiente información experimental para definir si es positiva o negativa se dice que es de signo desconocido y se aceptarán ambos signos en la regla lógica.

Regulación funcional y no-funcional

En una regla lógica generalmente se busca que todas las regulaciones sean funcionales o biológicamente plausibles, lo que significa que no contiene nodos que sean irrelevantes para el resultado de la función y por lo tanto dicha regla no pueda ser simplificada. Cuando esto no ocurre y un nodo de una regla es irrelevante para su resultado se dice que la regulación de dicho nodo es no-funcional. En el Cuadro 1 se muestran ambos tipos de regulaciones.

Regulación obligatoria e hipotética

En este trabajo se definió una tercera clasificación de regulaciones dependiendo de la información experimental que se haya encontrado:

Las regulaciones obligatorias deben estar confirmadas experimentalmente como una regulación física directa, es decir, las dos moléculas involucradas se unen físicamente. Además, estas regulaciones deben estar confirmadas por análisis de mutaciones en uno de los genes, gracias a lo cual se infiere si esta interacción genera una regulación positiva o negativa hacia el otro gen. Las uniones físicas entre dos moléculas pueden probarse experimentalmente por medio de técnicas como el Análisis de Doble Híbrido (ver Trigg *et al.*, 2017), la Inmunoprecipitación de Cromatina (ver Merelo *et al.*, 2013 y Brandt *et al.*, 2012) o por Co-inmunoprecipitación (ver Husbands *et al.*, 2016), que permiten encontrar uniones físicas entre dos proteínas o entre proteínas y regiones de ADN.

El grupo de regulaciones hipotéticas incluye a aquellas que no tienen suficiente evidencia experimental para poder confirmar su existencia; sin embargo, los resultados experimentales sugieren una interacción entre ambos genes. Por ejemplo, interacciones cuya única evidencia se basa en el cambio de expresión de un gen *B* en una planta con un gen *A* mutado, o donde se ha observado una unión física (por medio de los métodos arriba mencionados) pero no se ha confirmado que el gen *A* afecte la expresión del gen *B* por medio del análisis de mutantes.

Una regulación obligatoria de la red debe ser una regulación funcional y de signo conocido (ya sea positivo o negativo) en la regla lógica, mientras que una regulación hipotética puede ser tanto funcional como no-funcional y se permite que sea una regulación positiva, negativa o de signo desconocido (puede ser tanto positivo como negativo) en la regla lógica.

3.3. Formación y reducción de la RRG

Para definir el conjunto de moléculas y regulaciones involucradas en la generación de polaridad aB-aD se llevó a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva de los numerosos artículos de investigación que existen en relación al tema (ver Anexo Cuadro A1), con lo que se generó la gráfica de la red donde se representan los nodos (moléculas) y regulaciones entre nodos que la

componen. Al conjunto de nodos y regulaciones que conforman a la gráfica de la red se le llamará topología de la red. La topología de la red, específicamente la presencia de bucles de retroalimentación, definirá la aparición de propiedades dinámicas complejas en la red, como multiestabilidad (múltiples atractores de punto fijo) y oscilaciones (atractores cíclicos) (Thomas & D'Ari, 1990).

Se redujo la red quitando nodos que, al ser eliminados, no generan una pérdida de las propiedades dinámicas arriba nombradas (i.e. multiestabilidad y oscilaciones). Esto incluye a nodos “output” (nodos sin ninguna regulación obligatoria de salida) y nodos mediadores (nodos con sólo una regulación obligatoria de entrada y una obligatoria de salida) (Zañudo & Albert, 2013). A la red resultante, llamada Red Reducida, se le retiraron los nodos “input” (nodos sin ninguna regulación de entrada, ya sea obligatoria o hipotética), terminando con una red de 6 nodos y sus regulaciones obligatorias e hipotéticas llamada Red Mínima (RM).

Para definir los atractores esperados se usaron los patrones de expresión de los nodos de la RM en ambos lados (aBaxial y aDaxial) del primordio de hoja de *A. thaliana* (Anexo Cuadro A2). Para cada atractor (aB y aD) los nodos pueden tener tres posibles estados: si el gen se expresa en dicho lado del primordio se define como prendido (1). Si no muestra expresión se define como apagado (0). Si el gen tiene una expresión en gradiente y se expresa levemente en el lado correspondiente al atractor a definir pero de forma mínima comparada con el lado contrario, o si existe información experimental contradictoria al respecto (para un mismo lado del primordio hay artículos que afirman su expresión y artículos que afirman la falta de expresión), se define como indefinido (*) para dicho atractor, en el cual podrá estar tanto prendido como apagado.

3.4. Análisis manual de la red

En una red booleana pueden haber varias reglas lógicas que satisfagan las regulaciones de un nodo. Por ejemplo, si el nodo X es regulado por una regulación obligatoria positiva del nodo Y

y una regulación hipotética de signo desconocido del nodo Z, de las 16 posibles reglas lógicas que se generan con dos reguladores, como vemos en el Cuadro 1, serían las reglas 2, 3, 4, 8 y 12 las que satisfacen esas dos regulaciones, siendo que la regulación de Y, al ser obligatoria positiva, debe ser funcional de signo positivo; y la de Z, al ser hipotética de signo desconocido, puede ser funcional, no-funcional, de signo positivo, negativo o desconocido (como se explicó anteriormente en la sección 3.2). Al haber varias reglas lógicas que satisfacen las regulaciones de un nodo, también habrán varias redes booleanas que satisfagan las regulaciones de una RRG. Por esta razón se sacaron el total de combinaciones posibles de reglas lógicas que hay para las regulaciones tanto obligatorias como hipotéticas de la RM y con ello saber el total de redes que satisfacen las regulaciones documentadas experimentalmente.

Para esto, se generaron todas las posibles tablas de verdad (y su expresión booleana correspondiente) para cada uno de los nodos de la RM mediante los siguientes pasos: para cada nodo se obtienen todos sus posibles valores de salida partiendo de todas las combinaciones de valores de entrada de sus reguladores (como se observa en el ejemplo de el Cuadro 1 para el nodo X). En cada valor de salida se define el tipo de regulación (funcional o no-funcional, positiva o negativa) que genera cada regulador. De todas las posibles reglas lógicas del nodo se seleccionan aquellas donde el tipo de regulación de cada regulador coincide con su información experimental, como se hizo en el ejemplo al inicio de esta sección.

Una vez seleccionadas las reglas lógicas que cumplen con las información experimental de cada nodo, se calculó el número de combinaciones posibles de reglas entre los nodos de la red. El número obtenido representa el total de redes booleanas congruentes con las regulaciones entre los nodos de la RM. De ahora en adelante dichas redes booleanas se llamarán modelos.

3.5. Análisis radial empleando *Griffin*

Debido a que en el análisis manual de la RM se encontraron más de un millón de modelos que cumplen con las interacciones de la topología de la red, se decidió implementar el uso de *Griffin* (Muñoz *et al.*, 2018), una herramienta computacional que automatiza los pasos necesarios para la inferencia y análisis de redes booleanas síncronas, permitiendo incluir la información sobre las regulaciones entre nodos descrita arriba (i.e., regulaciones positivas, negativas, funcionales, obligatorias, e hipotéticas), además de ciertas restricciones biológicas como los atractores esperados.

Se implementó una estrategia de exploración radial, en la cual se buscan las redes booleanas que cumplan con las restricciones biológicas iniciando con una red centro compuesta únicamente por las regulaciones obligatorias y siguiendo con combinaciones de regulaciones hipotéticas agregadas a la red centro, hasta llegar al total de regulaciones hipotéticas deseado (ver más detalles en Resultados). Para esto se corrió en *Griffin* un código donde se indican los nodos de la red, las interacciones obligatorias e hipotéticas entre ellos, los atractores esperados y se determinó como cuatro el máximo número de regulaciones hipotéticas que se permiten en los modelos. El código implementado se encuentra disponible en: <https://github.com/marianayuste/Polaridad.git>

Se pueden encontrar más detalles sobre el uso de *Griffin* en su página (<http://turing.iimas.unam.mx/griffin/index.html>) o en Muñoz *et al.*, 2018.

3.6. Simulación de mutantes

A partir de una búsqueda en la información experimental disponible se definieron las mutantes a simular y las condiciones que se deben satisfacer para poder cumplir con ellas (Anexo Cuadro A3).

Para simular una mutante de pérdida o ganancia de función de un gen en RRG booleanas se corre la red desde todos los estados iniciales posibles, pero manteniendo el nodo del gen a mutar siempre en el mismo estado, ya sea en 0 representando su pérdida de función o en 1 su ganancia. Si los atractores obtenidos coinciden con los tipos celulares vistos en la planta mutante se dice que ese modelo cumple con dicha mutante. Esto se llevó a cabo usando el lenguaje de programación Python, simulando cada una de las mutantes en cada uno de los modelos obtenidos en la búsqueda radial. Los códigos con las funciones empleadas están disponibles en: <https://github.com/marianayuste/Polaridad.git> archivo `mutantes_sincrona`.

3.7. Análisis asíncrono

Al simular las mutantes de forma síncrona la mayoría de los modelos generaron atractores cíclicos. Dado que los atractores cíclicos en redes síncronas pueden ser el resultado de artefactos dinámicos, para eliminar aquellos atractores cíclicos formados por artefactos se llevó a cabo una simulación asíncrona.

Se usó un método de actualización asíncrona general (Harvey & Bossomaier, 1997; Saadatpour *et al.*, 2010), donde en cada paso de tiempo se selecciona aleatoriamente un solo nodo para actualizar su valor, todos los nodos teniendo la misma probabilidad de ser seleccionados en cada tiempo. Para seleccionar el nodo que se actualizará en cada tiempo se usó el módulo `Random` de Python (Van Rossum, 2020). Para obtener los atractores en la actualización asíncrona, en cada estado inicial se dejó correr la función durante 500 pasos de tiempo. Si se llegaba a un estado correspondiente a un atractor obtenido en la actualización síncrona la función se paraba y se aceptaba este estado como el atractor generado. Los códigos con las funciones empleadas están disponibles en: <https://github.com/marianayuste/Polaridad.git> archivo `mutantes_asincrona`.

3.8. Análisis de robustez

Se llevaron a cabo dos análisis de robustez en los modelos que cumplieron con la mayor cantidad de mutantes, con el fin de verificar que dichos modelos sean robustos a perturbaciones.

Perturbación de reglas lógicas

Usando el lenguaje de programación Python se hizo un bit flip (un cambio de 1 a 0 o de 0 a 1) en el resultado del primer renglón de la tabla de verdad de un nodo y se corrió el modelo con este cambio hasta obtener todos los atractores generados. Se hizo esta perturbación a cada uno de los renglones de las tablas de verdad de todos los nodos del modelo. Esto se llevó a cabo con todos los modelos, reuniendo la cantidad de perturbaciones que mantuvieron sin cambios los atractores originales, ya sea los estados de cada nodo o los tipos celulares que representan.

Comparación con redes aleatorias

Para cada uno de los modelos se le generaron 100 redes aleatorias usando la paquetería BoolNet en R (Müssen *et al.*, 2010), donde cada nodo tuviera la misma cantidad de reguladores que en la red original. Se llevó a cabo el análisis de perturbación de reglas lógicas anterior en cada una de las redes aleatorias y se obtuvo el promedio de perturbaciones que mantuvieron sin cambios los atractores en las 100 redes. Este promedio se comparó con el número de perturbaciones sin cambios obtenido en la red original en el análisis anterior.

El análisis de comparación con redes aleatorias se implementó dos veces: con redes aleatorias donde no se permitiera tener regulaciones no-funcionales y con redes aleatorias donde sí se permitiera. Esto se hizo cambiando el valor del argumento “noIrrelevantGenes” en la función “generateRandomNKNetwork” de BoolNet (Müssen *et al.*, 2010).

Los esquemas y gráficas de regulación se hicieron usando el programa Adobe Illustrator versión 24.0 (<https://www.adobe.com/>).

Los códigos se hicieron en el lenguaje de programación Python versión 3.8.3 (Python Software Foundation, <https://www.python.org>).

4. Resultados

4.1. Definición de la Red General

Se hizo una revisión exhaustiva de la literatura disponible incluyendo la lectura de cientos de artículos, de los cuales 54 abarcan la información necesaria para definir los genes, microRNAs y hormonas que han sido documentados como partícipes en la determinación de la polaridad aB-aD en la hoja de *A. thaliana*, además de las posibles regulaciones entre estas biomoléculas (ver Anexo Cuadro A1). A la red generada con esta información se le llamó Red General (Figura 3).

La Red General consiste en 21 nodos que representan genes, microRNAs y hormonas que se encuentran relacionados entre sí por 47 regulaciones. Las regulaciones se categorizaron en dos grupos, dependiendo de la calidad de su evidencia experimental, teniendo 22 regulaciones obligatorias y 25 regulaciones hipotéticas (ver Figura 3 y Anexo Cuadro A1). Las obligatorias son regulaciones que cuentan con un sustento experimental sólido, mientras que el soporte experimental de las regulaciones hipotéticas no es suficiente para confirmarlas (ver más detalles en Métodos).

En el caso del nodo aux, correspondiente a la fitohormona auxina, aunque las dos regulaciones que lo afectan (de parte de *KANI* y *REV*) no ocurren de forma directa dado que sus proteínas

no se unen físicamente a la molécula de auxina, hay pruebas que indican que estos dos genes regulan directamente a moléculas responsables de la producción o transporte de dicha hormona, por lo que se tomaron como regulaciones obligatorias (ver detalles en Anexo Cuadro A1).

Todos los nodos, a excepción de miR165/166, *ASI-AS2* y *ZPR1-4*, representan una única biomolécula. El nodo miR165/166 representa a dos microRNAs, miR165 y miR166, cuyas secuencias difieren entre sí sólo por un nucleótido y ambas cumplen las mismas funciones al compartir las mismas secuencias blanco (Zhou *et al.*, 2007; Merelo *et al.*, 2016), por lo que serán tomados como un solo nodo en este trabajo. Por su parte, aunque los genes *ASI* y *AS2* pertenezcan a familias genéticas distintas, se ha observado que requieren unirse entre sí para regular la expresión de sus genes blanco (Iwasaki *et al.*, 2013; Kuhlemeier y Timmermans, 2016), por lo que se decidió tomar al heterodímero (aquí llamado *ASI-AS2*) como el nodo que los representa en esta red. El nodo *ZPR1-4* representa a cuatro genes de la familia *LITTLE ZIPPER (ZPR)*, todos los cuales codifican para proteínas que se unen e inhiben la expresión de genes de la familia *HD-ZipIII* incluyendo *PHB*, *PHV* y *REV* y a su vez son inducidos por *REV* (Wenkel *et al.*, 2007; Reinhart *et al.*, 2013), por lo que se decidió meter a los cuatro genes en un mismo nodo.

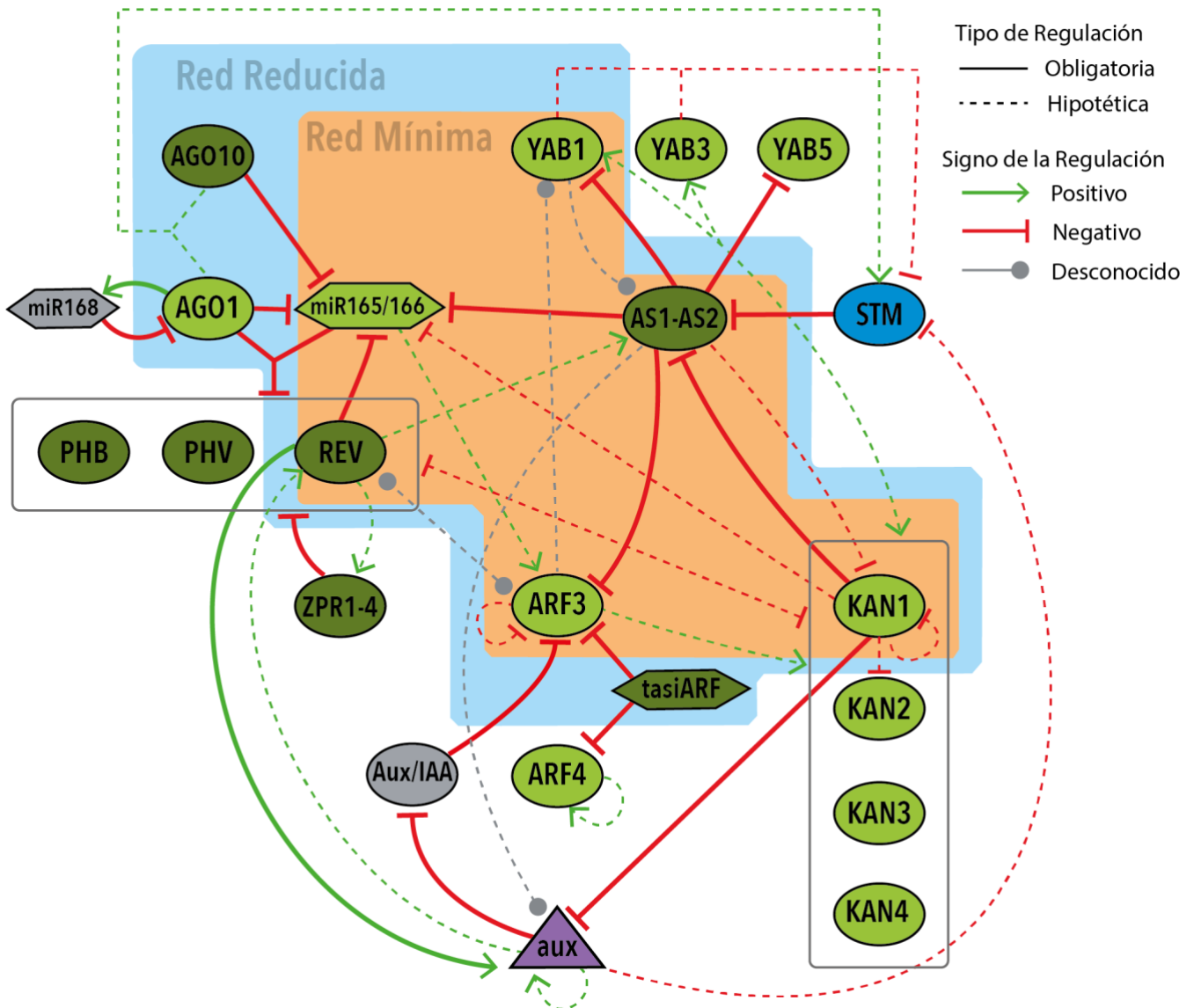


Figura 3. Representación gráfica de la Red General de la RRG de polaridad aB-aD.

Se muestran todos los nodos (genes, microRNAs y hormonas) e interacciones que tienen un papel en la generación de polaridad aB-aD en *A. thaliana*. Los nodos que representan la Red Reducida se encuentran dentro del polígono azul. Los nodos de la Red Mínima se encuentran dentro del polígono naranja y en la Figura 4. Los nodos ovalados representan genes (ya sean factores de transcripción o de otro tipo), los hexagonales microRNAs y el triangular la hormona auxina. El color de los nodos representa su expresión en el primordio de hoja: verde oscuro con expresión aBaxial, verde claro aDaxial, azul meristemática, morado expresión en toda la hoja, gris expresión desconocida. Las flechas de color verde representan interacciones positivas, las de color rojo y punta plana son interacciones negativas, las grises y con terminación en círculo son de signo desconocido (pueden ser positivas o negativas). Las flechas continuas representan interacciones obligatorias y las de líneas punteadas representan regulaciones hipotéticas. Algunas flechas surgen de o señalan a un rectángulo que rodea varios nodos, representando regulaciones que son generadas o que afectan, respectivamente, a todos los nodos dentro de dicho rectángulo. En esta figura se observan todas las regulaciones obligatorias e hipotéticas de la Red General excepto 3 regulaciones hipotéticas que no pudieron agregarse por falta de espacio, dichas regulaciones están marcadas en Cuadro A1 de Anexo.

4.2. Reducción de la Red General y creación de una Red Mínima

Para facilitar el análisis de la red se llevaron a cabo dos reducciones de esta. La primera reducción consistió en descartar todos los nodos tipo “output” (nodos sin ninguna regulación de salida) y nodos mediadores (nodos con sólo una regulación de entrada y una de salida) de la Red General, tomando en cuenta únicamente las regulaciones obligatorias, lo que nos generó una Red Reducida (polígono azul de la Figura 3). La segunda reducción consistió en descartar a todos los nodos “input” (sin ninguna regulación de entrada) de la Red Reducida, tomando en cuenta tanto regulaciones obligatorias como hipotéticas, lo que nos generó una Red Mínima (polígono naranja de la Figura 3 y toda la Figura 4), con la que se trabajará el resto de los análisis.

4.2.1. Creación de una Red Reducida

Se decidió reducir la Red General descartando nodos que fueran dinámicamente irrelevantes, es decir, nodos que al ser eliminados no generan una pérdida de las propiedades dinámicas importantes de la red como multiestabilidad u oscilaciones (Zañudo & Albert, 2013). Esto incluye a los nodos “output” (nodos sin ninguna regulación de salida) y nodos mediadores (nodos con sólo una regulación de entrada y una de salida), tomando en cuenta únicamente las regulaciones obligatorias. Al quitar un nodo mediador se conectó su regulación de entrada con la que generaba de salida, obteniendo una nueva regulación que será positiva o negativa según el producto de las dos originales (+ + genera +, + - genera -, - - genera +).

Descartar estos nodos produce una versión topológicamente reducida de la red pero con la que se puede hacer una descripción completa de su dinámica (Saadatpour *et al.*, 2010), lo que nos permite identificar los nodos y regulaciones esenciales para comprender la genética del desarrollo de la polaridad en un primordio de hoja. Además, como se pretende identificar el

total de modelos congruentes con las regulaciones de la topología de la red (ver más detalles en la sección 4.4: Análisis manual de la red), el tener nodos irrelevantes para su dinámica sólo aumentará el espacio de búsqueda sin darnos información útil. La red generada a partir de estas reducciones, llamada Red Reducida, se puede observar en el polígono azul de la Figura 3.

El nodo *YABI* supuso un caso particular pues, pese a su irrelevancia para la dinámica de la red al no tener ninguna regulación obligatoria, juega un rol biológico importante en la polaridad. Además de tener una clara expresión restringida del lado aBaxial en todos los primordios de órganos laterales de *A. thaliana* analizados en la literatura revisada (Siegfried *et al.*, 1999; Eshed *et al.*, 2001), las plantas con mutaciones en *YABI* generan fenotipos con una evidente alteración en la polaridad aB-aD (Kumaran *et al.*, 2002; Bonaccorso *et al.*, 2012). Asimismo, la familia de genes *YABBY* mantiene una expresión polar en distintos taxones de angiospermas y se ha propuesto que dicha familia ha tenido un papel importante en la generación de la morfología de las hojas planas (incluyendo la polaridad aB-aD) durante la evolución de las megáfilas (Yamada *et al.*, 2011). Las regulaciones confirmadas experimentalmente como directas no son suficientes para explicar esta aparente importancia de *YABI* en la generación de polaridad, por lo que se decidió mantenerlo en la red para averiguar si las regulaciones que clasificamos como hipotéticas, y que aún no han sido confirmadas directamente en laboratorio, puedan ser el motivo de esta importancia.

De la misma forma, *ARF3* parece ser un nodo “output” al no tener ninguna regulación obligatoria de salida, pero hay fuertes pruebas experimentales que confirman la unión directa de *ARF3* a *YABI* (García *et al.*, 2006; Trigg *et al.*, 2017), a pesar de ser tomada como regulación hipotética debido a la falta de información respecto a si es una regulación positiva o negativa (Tiwari *et al.*, 2003). Debido a ello se decidió mantener a *ARF3* dentro de la Red Reducida y así encontrar el tipo de regulación hacia *YABI* que apoya el modelo.

El nodo *ZPRI-4*, a pesar de tener una regulación obligatoria de salida hacia *REV*, dado que su única regulación de entrada es también de *REV* y a pesar de ser una regulación hipotética se decidió tomarlo como nodo mediador y descartarlo de la red, dejando únicamente una auto regulación hipotética negativa en *REV*.

Además de quitar nodos irrelevantes para la dinámica de la red, también se decidió retirar a los nodos *STM* y auxina por razones biológicas. El gen *STM* cumple un papel importante en el mantenimiento de las células meristemáticas, por lo que tiene una fuerte expresión en el meristemo central y periférico, pero su expresión se vuelve nula en células que se comienzan a diferenciar para formar primordios de hoja (Lynn *et al.*, 1999). Por su parte, la hormona auxina parece ser la principal responsable de iniciar la diferenciación del primordio de hoja: su acumulación en un grupo de células del meristemo periférico impulsará un cambio en sus programas de expresión genética, promoviendo la formación de un primordio foliar en esa zona y al inicio de los programas genéticos responsables del desarrollo de la hoja, incluyendo la polaridad aB-aD (Rast y Simon, 2012; Conklin *et al.*, 2019; Kuhlemeier, 2017; Yu *et al.*, 2017). Dado que el objetivo de este trabajo es modelar el establecimiento de la polaridad aB-aD en el primordio de hoja una vez que ya ha iniciado su diferenciación, se decidió eliminar ambos nodos y sus regulaciones de la red. En el caso de la auxina, al ser una hormona sumamente importante en el desarrollo de órganos (como se explicó en la introducción), podría determinar el atractor al que llegue la red. Por ello más adelante se hará un análisis reincorporando dicha hormona (ver sección 4.8).

4.2.2. Creación de una Red Mínima

Para acortar la red aún más y facilitar su análisis y la búsqueda de modelos congruentes con las regulaciones de la topología de la red, se decidió retirar a los nodos “input” de la Red Reducida. Esto incluye a aquellos nodos sin ninguna regulación de entrada, ya sea obligatoria o hipotética,

por lo que, si se conservan en la red, su valor se mantendrá igual a su valor inicial a lo largo del tiempo. A la red resultante se le llamará de ahora en adelante Red Mínima (RM) (Dentro del polígono naranja de la Figura 3 se observan los nodos que la conforman y en la Figura 4 se ve la red resultante). La regulación $AGO1 \dashv\vdash AGO1$ (generada al descartar el nodo mediador miR168), al ser la única regulación hacia $AGO1$, no permite alcanzar un atractor de punto fijo (atractor de un solo estado) ya que dicho nodo se mantendrá en un ciclo constante de prendido-apagado. Como el modelo busca generar únicamente atractores de punto fijo (ver siguiente sección) se retiró dicha regulación, convirtiendo al nodo $AGO1$ en un nodo “input”, por lo que también se retiró de la red.

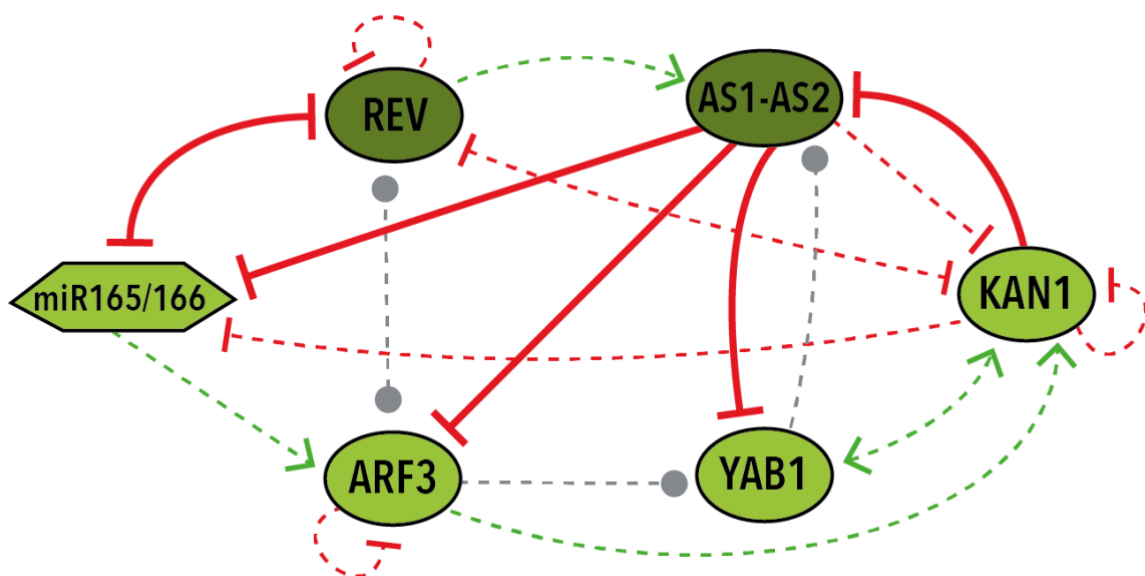


Figura 4. Representación gráfica de la Red Mínima.

Se muestran los nodos y regulaciones de la Red Mínima resultante de las dos reducciones llevadas a cabo en la Red General y la Red Reducida. Ver la sección 4.2. Reducción de la Red General y creación de una Red Mínima para más detalles. A diferencia de la Figura 3, aquí se muestran todas las regulaciones entre los nodos de la Red Mínima, tanto obligatorias como hipotéticas. La simbología es la misma que en la Figura 3.

4.3. Definición de los atractores esperados

Como se mencionó en Métodos, los atractores generados en una red booleana representan patrones de expresión genética de los diferentes tipos celulares del sistema bajo estudio. Puesto que el objetivo principal de este trabajo es modelar el aspecto genético del establecimiento de la polaridad aB-aD en el primordio de hoja, se definieron los dos atractores que se esperan generar según los patrones de expresión que tienen los nodos de la RM en las células aBaxiales y aDaxiales de un primordio de hoja de *A. thaliana*. Dichos atractores se observan en la Figura 5 donde cada nodo puede estar prendido (1) o apagado (0). Los nodos indefinidos, cuyo valor se representa por un asterisco (*), pueden ser tanto 0 como 1 en ese atractor (debido a una expresión mínima en dicho lado comparada con el lado contrario). Los nodos indefinidos permiten que un tipo celular (aB o aD) pueda estar representado por más de un estado de la red. Por ejemplo, el tipo celular aB está correctamente representado por los estados [1, 1, 1, 1, 1, 0] y [1, 1, 1, 1, 0, 0] (cada vector contiene los valores de los nodos de la RM siguiendo el orden de la Figura 5), donde el nodo REV puede ser tanto 1 como 0 al ser un nodo indefinido para el atractor aB.

La generación de únicamente los dos atractores aB y aD será la restricción biológica a utilizar para seleccionar los modelos que cumplan con las regulaciones de la red.

| | YAB1 | ARF3 | miR165/ 166 | KAN1 | REV | AS1-AS2 |
|---------|------|------|----------------|------|-----|---------|
| aDaxial | * | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| aBaxial | 1 | 1 | 1 | 1 | * | 0 |

Figura 5. Atractores esperados en la RM.

Se muestran los valores de cada nodo de la RM para cada atractor esperado. Si el valor de un nodo está representado por un asterisco (*) dicho nodo puede estar tanto prendido (1) como apagado (0) en ese atractor.

4.4. Análisis manual de la red

Dado que para una misma topología de una red pueden existir varios conjuntos de reglas lógicas que cumplen con sus regulaciones (más detalles en Métodos), se calculó el número de redes booleanas totales que satisfacen a la topología de la RM.

Se encontró que hay más de un millón de redes booleanas (modelos) que satisfacen las regulaciones de la RM. Hacer un análisis manual de esa cantidad de modelos para localizar cuáles son los que cumplen con la restricción biológica de los atractores implicaría una inversión de tiempo enorme, por lo que se decidió implementar el uso de *Griffin* (Muñoz *et al.*, 2018), una herramienta computacional que automatiza los pasos necesarios para la inferencia y análisis de redes booleanas síncronas. En particular, *Griffin* permite incluir la información correspondiente a las regulaciones entre los nodos, ya sean conocidas o hipotéticas, positivas, negativas y funcionales, además de ciertas restricciones biológicas como son los atractores esperados. Como salida devuelve los modelos que cumplen con las restricciones incluidas (Muñoz *et al.*, 2018).

4.5. Análisis empleando *Griffin*

Para encontrar las redes booleanas que satisfagan las regulaciones de la RM y cumplan con los atractores esperados se decidió implementar una estrategia de exploración radial en *Griffin*.

En la estrategia de exploración radial primero se genera una red de regulación que incluye únicamente las regulaciones obligatorias. A esta red se le llamará centro y se dirá que tiene un radio = 0. Después se obtendrán todas las redes posibles que se generan al agregarle una única regulación hipotética a la red centro, que serán las redes de radio = 1. Luego se generarán las redes de radio = 2 que incluyen a todas las redes que se generan al agregar dos regulaciones hipotéticas a la red centro, y así sucesivamente hasta obtener las redes de radio n , donde n es el

número de regulaciones hipotéticas totales, o hasta generar las redes del radio especificado (Muñoz *et al.*, 2018).

En la Figura 6 se encuentra un ejemplo de exploración radial usando una red de 3 nodos.

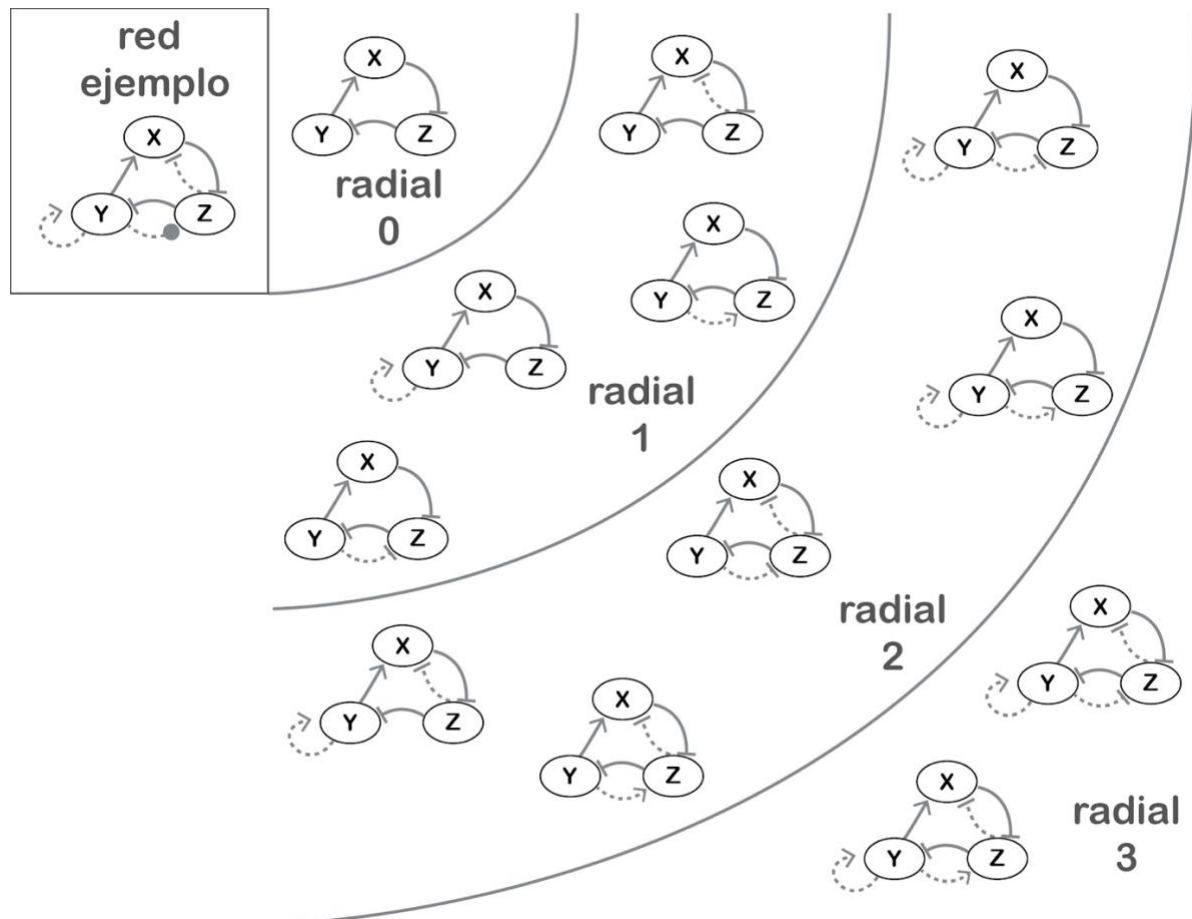


Figura 6. Ejemplo de exploración radial usando una red de tres nodos.

La red ejemplo se compone de tres nodos (X, Y, Z) y 6 regulaciones: 3 obligatorias (flechas continuas) y 3 hipotéticas (flechas punteadas). La terminación de cada flecha representa el signo de la regulación: en punta para positivas, planas para negativas y en círculo para signo desconocido (puede ser positiva o negativa). En la zona radial 0 se encuentra la red centro, que incluye únicamente las regulaciones obligatorias de la red ejemplo y ninguna hipotética. En radial 1 se encuentran todas las redes posibles con una regulación hipotética, en radial 2 con dos y en radial 3 con tres regulaciones hipotéticas. Al haber tres regulaciones hipotéticas totales en la red, el radio máximo al que se puede explorar es 3. En radial 3 hay dos redes posibles debido a la regulación de Y a Z, que es de signo desconocido, por lo que se exploran las dos posibilidades: que sea positiva o negativa. Lo mismo ocurre con las redes de radial 1 y 2 en dicha regulación.

La exploración radial nos permite saber si las regulaciones obligatorias son suficientes para obtener los atractores esperados. De no ser así, nos permite encontrar cuántas y cuáles son las regulaciones hipotéticas que lo posibilitan. En este trabajo, siguiendo el principio de parsimonia, los modelos que con menos regulaciones hipotéticas (menos suposiciones) logren obtener los atractores esperados serán con los que se seguirá trabajando. Una exploración radial en *Griffin* de la RM hasta radio 4 encontró 1905 modelos que cumplen con las regulaciones especificadas y sólo generan los dos atractores esperados.

Los siguientes análisis se hicieron con este grupo de modelos. Como se observa en el Cuadro 2, no hay ningún modelo con cero o sólo una regulación hipotética que logre generar únicamente los atractores esperados, por lo que de acuerdo a nuestros análisis, la RM requiere de dos o más regulaciones hipotéticas para obtener únicamente los dos atractores esperados. Ninguna regulación hipotética se comparte entre todos los modelos generados, las regulaciones hipotéticas más usadas fueron: REV → AS1-AS2 (incluida en 1163 modelos), ARF3 → KAN1 (865 modelos) y REV --I KAN1 (791 modelos).

Cuadro 2. Número de modelos que se obtienen con cada radio (hasta radio 4) a partir de la exploración radial en *Griffin* y que generan únicamente los dos atractores esperados.

| Radio | Total de modelos |
|-------|------------------|
| 0 | 0 |
| 1 | 0 |
| 2 | 14 |
| 3 | 189 |
| 4 | 1702 |
| Total | 1905 |

4.6. Validación de los modelos por análisis de mutantes

Una vez reunidos todos los modelos recuperados por *Griffin* en la exploración radial se seleccionaron los que coincidieran con la mayor cantidad de información experimental. Para ello se hicieron simulaciones de distintas mutantes en cada uno de los modelos, y los atractores resultantes se compararon con los patrones de expresión genética reportados experimentalmente. Cuando los atractores de las simulaciones de mutantes concuerdan con la información experimental se dice que dicho modelo cumple con la mutante. Se seleccionaron los modelos que cumplieran con el mayor número de mutantes.

4.6.1. Mutantes a simular y definición de las reglas de cumplimiento

Se definieron las mutantes a simular a partir de una búsqueda en la información experimental disponible.

Los resultados experimentales permitieron caracterizar de dos formas distintas a los mutantes de ganancia y pérdida de función: (1) cambios generados en la expresión de otros genes debidos a una mutación, y (2) pérdida o un aumento espacial de alguno de los tipos celulares en la planta mutada (para este último se tomaron en cuenta únicamente los tipos celulares aB y aD). Con esta información se decidió dividir el cumplimiento de la simulación de una mutante en dos tipos de reglas:

- *Regla de expresión:* El valor de un gen cuyo nivel de expresión aumenta debido a una mutación debe ser 1 en todos los atractores. Si su expresión disminuye debe ser 0 en todos los atractores.
- *Regla de tipo celular:* El tipo celular conservado o aumentado debido a una mutación debe estar representado en los atractores. Si el tipo celular disminuye o se pierde por completo debe eliminarse de los atractores.

Se distinguió entre estos dos tipos de reglas ya que, debido a los nodos indefinidos, puede ocurrir que la simulación de una mutante reproduzca los cambios en la expresión de un gen no mutado pero no los cambios de los tipos celulares o viceversa. Como se explicó en la sección 4.3., los nodos indefinidos permiten que un mismo tipo celular pueda ser representado por más de un estado de la red. Por lo tanto, si una simulación cumple con la presencia o ausencia de un atractor, no necesariamente va a cumplir con el valor de un nodo si ese nodo es indefinido para dicho atractor.

En el Cuadro 3 se muestran las mutantes a simular y los requerimientos para cumplir su regla de expresión y/o de atractores. En total se simularon 14 mutantes, de las cuales 11 representan mutaciones simples y 3 representan mutaciones dobles. Debido a la falta de información experimental no todas las mutantes tienen ambas reglas. En total hay 8 reglas de expresión y 10 reglas de tipo celular.

Cuadro 3. Mutantes a simular y sus reglas de cumplimiento.

En la columna Nodo mutado se muestra el(los) nodo(s) cuya mutación se va a simular, ya sea de ganancia (nodo siempre en 1) o pérdida (nodo siempre en 0) de función. En las dos columnas de Reglas se muestran los requerimientos para cumplir con cada tipo de regla en dicha mutante, ya sea obtener un valor específico de uno o más nodos en todos los atractores obtenidos (Reglas de expresión) o cumplir con los atractores eliminados y/o conservados (Reglas de tipo celular). aD: aDaxial, aB: aBaxial.

| Nodo mutado | Reglas | |
|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| | de expresión | de tipo celular |
| $YABI = 1$ | $REV = 1$ | se elimina aD, se conserva aB |
| $ARF3 = 1$ | - | se conservan aD y aB |
| $ARF3 = 0$ | - | se elimina aB, se conserva aD |
| $KANI = 1$ | - | se elimina aD, se conserva aB |
| $KANI = 0$ | - | se elimina aB, se conserva aD |
| $miR165/166 = 1$ | $ARF3 = 1$ | - |
| $miR165/166 = 0$ | $ARF3 = 0$ y $ASI-AS2 = 1$ | - |
| $REV = 1$ | $YABI = 0$ | se elimina aB, se conserva aD |
| $REV = 0$ | $YABI = 1$ | se elimina aD, se conserva aB |
| $ASI-AS2 = 1$ | $REV = 1$ | se elimina aB, se conserva aD |
| $ASI-AS2 = 0$ | $REV = 0$ | - |
| $ASI-AS2 = 0$ y $ARF3 = 0$ | $YABI = 1$ | - |
| $KANI = 1$ y $ARF3 = 0$ | - | se conservan aD y aB |
| $KANI = 0$ y $ARF3 = 0$ | - | se elimina aB, se conserva aD |

4.6.2. Simulación de mutantes con actualización síncrona y asíncrona

Como se explicó en Métodos, las redes booleanas se pueden categorizar en redes síncronas o asíncronas según la forma en la que se actualicen los valores de sus nodos. En la sincronía cada estado de la red tiene un sólo posible sucesor. René Thomas, junto con colaboradores (Thomas, 1973; Thomas & d'Ari, 1990), mostró que esto, a pesar de darle la virtud de la simplicidad, hace que la sincronía sea una sobresimplificación del sistema a modelar, pues no toma en cuenta que los genes de una red pueden requerir de tiempos distintos para sintetizar o degradar su producto hasta que éste sobrepase un umbral donde se pueda decir que se encuentra prendido o apagado. Además, la actualización síncrona en redes con bucles de retroalimentación puede generar oscilaciones entre estados, las cuales aparecen debido a la equidad en los tiempos de actualización de cada nodo, generando atractores cíclicos que son artefactos del tipo de actualización. Por ejemplo, supongamos un circuito donde dos nodos X y Y se inhiben mutuamente (Figura 7). Este circuito tiene dos estados estables, 10 y 01. Sin embargo, tiene diferentes dinámicas cuando se modela síncronamente y asíncronamente. Comenzando desde el estado 00, en una actualización síncrona pasaríamos al estado 11, dando lugar a oscilaciones entre estos dos estados, 00 y 11, como se observa en la imagen de enmedio de la Figura 7.

Debido a esto, se piensa que la asincronía provee de una descripción más realista del sistema biológico al permitir que los cambios en el valor de los nodos se den de forma independiente. Además, esto ocasiona que cada estado pueda tener más de un posible sucesor, lo que elimina los artefactos debidos a la sincronía. Aunado a esto, cuando la información experimental es suficiente, la asincronía permite usar ciertos esquemas que toman en cuenta los distintos tiempos de activación que tiene cada gen de la red (García-Gómez *et al.*, 2017). Después de los hallazgos de Thomas (Thomas, 1973; Thomas & d'Ari, 1990), varios trabajos como el de Saadatpour y colegas (2010) han confirmado que la actualización asíncrona representa mejor a los sistemas biológicos.

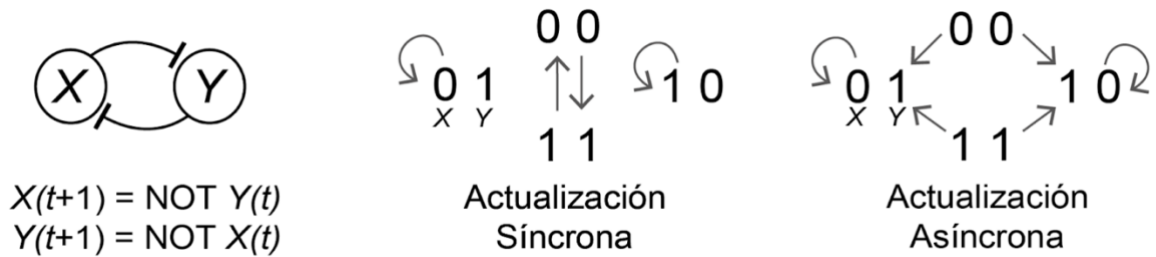


Figura 7. Ejemplo de una red de dos nodos que se inhiben mutuamente. Se representa la dinámica del espacio de estados con una actualización síncrona y asíncrona. Del lado izquierdo se observa la topografía del circuito y las reglas lógicas de cada nodo.

Al pasar el ejemplo anterior a un régimen asíncrono donde solo uno de los nodos se actualiza a cada paso de tiempo, tanto del estado 00 y 11, pasaríamos al estado 01 o 10, los cuales son estados estables, eliminando de esta forma las oscilaciones que eran un artefacto de la sincronía (Figura 8). Tomando esto en cuenta, se hizo una primera simulación con una actualización síncrona de las 14 mutantes (Cuadro 3) en todos los modelos, obteniendo 3 modelos que cumplieron un máximo de 16 de las 18 reglas. De los 1905 modelos, 1879 generaron atractores cíclicos en al menos una de sus mutantes, incluidos los 3 modelos con más reglas cumplidas. Se procedió a hacer la simulación con una actualización asíncrona y, como se tenía previsto, la mayoría de los atractores cíclicos desaparecieron: sólo 314 de los 1905 modelos generaron atractores cíclicos en alguna de sus mutantes (1565 modelos menos que en la actualización síncrona), sugiriendo que la mayoría de los atractores cíclicos generados en las simulaciones síncronas de mutantes eran un artefacto de la sincronidad y no un resultado de la dinámica de la red.

Los atractores aB y aD, así como el cumplimiento de mutantes se mantuvieron sin cambios en todos los modelos.

Los modelos con más mutantes cumplidas son los mismos 3 modelos anteriores, pero estos forman parte de los modelos que aún generan atractores cíclicos en al menos una de sus

mutantes. Dado que para todos los mutantes se debían generar atractores de punto fijo, se prosiguió a buscar los modelos con más mutantes cumplidas y sin atractores cíclicos.

Los que cumplen más mutantes sin ningún atractor cíclico en ninguna de sus simulaciones son 36 modelos con 15 reglas cumplidas.

Todos los 3 modelos con 16 reglas cumplidas, pero con atractores cíclicos, comparten las mismas 4 regulaciones hipotéticas: $KANI \rightarrow KANI$, $REV \rightarrow ASI-AS2$, $REV \rightarrow KANI$ y $YABI \rightarrow KANI$.

Por su lado, de los 36 modelos con 15 reglas cumplidas y sin atractores cíclicos, 5 modelos tienen 3 regulaciones hipotéticas y 31 modelos tienen 4. Todos tienen la regulación hipotética $REV \rightarrow ASI-AS2$. Los 36 modelos representan a 16 redes de interacción distintas, de las cuales una también está representada en los 3 modelos anteriormente descritos (Ver gráficas de las redes de interacción en Anexo Figura A1).

Ninguno de los 39 modelos recién descritos cumplió con la regla de expresión de la mutante simple $YABI=1$. Ninguno de los 1905 modelos cumplió con la regla de atractores de la doble mutante $KANI=1$ $ARF3=0$.

4.7. Análisis de robustez

Una característica importante de las RRG es su robustez (Aldana *et al.*, 2007). Por este motivo, se buscó dentro de los modelos con más mutantes cumplidas a aquellos que fueran más robustos a perturbaciones. Para ello se hicieron perturbaciones sistemáticas a las reglas lógicas de cada nodo compilando los atractores generados.

En particular, se hicieron dos tipos de perturbaciones en cada modelo. El primero consistió en modificar de forma independiente cada una de los renglones (cambiando su valor de 0 a 1 o de 1 a 0 según el caso, método llamado bit-flip) de la tabla de verdad de cada nodo del modelo y obtener el porcentaje de aquellas que hubieran mantenido sin cambios los atractores esperados.

El segundo consistió en generar 100 redes aleatorias con estructura similar al modelo (misma cantidad de reguladores en cada nodo) y en cada una realizar la perturbación arriba descrita, comparando el promedio de porcentajes de perturbaciones sin cambios de las 100 redes aleatorias con el porcentaje de la red original antes calculado. Estos dos análisis se realizaron en 39 modelos: los 3 modelos con 16 reglas de mutantes cumplidas y atractores cíclicos y los 36 modelos con 15 reglas cumplidas y sin atractores cíclicos.

De estos 39 modelos, 2 tienen la mayor cantidad de perturbaciones sin cambios en el valor de todos los nodos de sus atractores originales (33.3% de las perturbaciones). Si se comparan por tipos celulares representados en los atractores, se obtiene que los mismos 2 modelos mantienen los tipos celulares aB y aD en la mayor cantidad de perturbaciones (54.17% de las perturbaciones). Esto tomando en cuenta perturbaciones que generan uno o más atractores nuevos además de los que representan a aB y aD. Si se toman en cuenta las perturbaciones que mantienen únicamente estos dos tipos celulares, siguen siendo estos mismos 2 modelos los que obtienen la mayor cantidad de perturbaciones que mantienen solamente los tipos celulares originales (37.5% de las perturbaciones). Ambos modelos tienen una misma topología de red, compartiendo las mismas 4 regulaciones hipotéticas (Figura 8).

Al comparar el porcentaje de perturbaciones sin cambios que tuvo la red original de cada modelo, aquí llamado Porcentaje del Modelo Original (PMO), con el promedio de dichas perturbaciones en sus 100 redes aleatorias, aquí llamado Promedio de porcentajes de las Redes Aleatorias (PRA), se encontró que la mayoría de los modelos (32 de los 39) tienen un PMO mayor que su PRA. El modelo con más diferencia entre estos dos porcentajes obtuvo un PMO de 31.8% y un PRA de 18.9% (12.8 SD), habiendo una diferencia de 12.9 entre ambos porcentajes. En el caso de los 2 modelos que obtuvieron mayor robustez en su red original, ambos tuvieron un PMO mayor que su PRA. El análisis de comparación con redes aleatorias se repitió implementando una creación de redes aleatorias donde se aceptaran regulaciones no-

En las redes booleanas obtenidas las únicas regulaciones generadas por aux fueron activaciones hacia sí mismo y hacia ARF3, un nodo sin regulaciones de salida en esta red (Figura 8), por lo que no se cumplió con lo esperado.

5. Discusión

5.1. Modelaje matemático

5.1.1. Modelos congruentes con la información experimental disponible

En este trabajo se construyó un modelo booleano de la RRG involucrada en el desarrollo de la polaridad aBaxial-aDaxial en primordio de hoja de *A. thaliana*. Para ello se revisó la información experimental disponible, lo que permitió obtener una Red General conformada por 21 genes, microRNAs y hormonas que se relacionan entre sí por 47 regulaciones de activación e inhibición, de las cuales 22 tienen información experimental suficiente para confirmar una regulación física directa. Después de dos reducciones a la red, se terminó trabajando con una Red Mínima compuesta por 6 nodos, 6 regulaciones obligatorias y 16 hipotéticas. Se encontró que son más de un millón de redes booleanas (modelos) las que satisfacen la topología de esta red. Por este motivo se decidió buscar los modelos que no sólo cumplieran con la topología de la RM, sino que también obtuvieran los atractores que representan a los tipos celulares aB y aD. Se encontraron un total de 1905 modelos distintos que satisfacen las regulaciones de la RM y cuyos atractores representan a los tipos celulares aB y aD. Todos los modelos encontrados requirieron de mínimo dos regulaciones hipotéticas para obtener los atractores esperados. Este resultado no fue inesperado: se sabe que una condición necesaria para obtener multiestabilidad en una red (múltiples atractores de punto fijo) es la presencia de bucles de retroalimentación positivos en su estructura (Thomas & d'Ari, 1990). Dado que en la búsqueda

de modelos congruentes con las regulaciones de la RM se especificó que éstos generaran únicamente los dos atractores de punto fijo correspondientes a los tipos celulares aBaxial y aDaxial, se tenía previsto que la red podría necesitar como mínimo una interacción hipotética que permitiera generar otro bucle de retroalimentación positivo además del que había entre *REV* y miR165/166, pues éste último genera una oscilación que se vuelve estable entre ambos nodos, reflejándose en un atractor cíclico debido a la actualización síncrona de los modelos (Thomas & d'Ari, 1990).

Son varias regulaciones hipotéticas las que por sí solas generarían un bucle positivo en la RM, incluyendo *REV*→*KANI*, *YAB1*→*KANI*, *ASI-AS2*→*KANI*, *ARF3*→*KANI*. Incluso al correr modelos con sólo una de estas regulaciones hipotéticas se generan los dos atractores esperados (resultado no incluido). Pero agregar una sola regulación hipotética a la RM es insuficiente, incluso si es parte de las que generan un bucle positivo, ya que se producen otros atractores además de los dos esperados. Para eliminar atractores cíclicos y poder obtener únicamente atractores aB y aD los modelos requieren de mínimo dos regulaciones hipotéticas en la red. El hecho de que todos los modelos hayan requerido de mínimo dos regulaciones que no tienen suficiente respaldo experimental para ser confirmadas, y que ninguna de estas regulaciones hipotéticas formó parte de todos los modelos encontrados, sugiere que parte de esta vasta cantidad de modelos se debe a una falta de información experimental que reduzca el espacio de redes booleanas congruentes con la RM.

Aún así, habría que analizar con más detalle qué funciones (i.e. formar bucles) llevan a cabo las regulaciones hipotéticas en cada uno de los modelos y si estas funciones son las mismas, pues de ser así la cantidad de modelos y regulaciones hipotéticas distintas se podría interpretar como una cualidad del sistema, donde las regulaciones necesarias para producir los atractores esperados las pueden cumplir múltiples genes.

Es importante puntualizar que estos resultados y conclusiones fueron posibles gracias a la implementación de *Griffin* (Muñoz *et al.*, 2018), herramienta que permitió la búsqueda de todos los modelos posibles, incorporando toda la información disponible y ocupando una inversión de tiempo mínima.

5.1.2. Sincronía o Asincronía en modelos booleanos

Más allá de la eliminación de atractores cíclicos, el paso de una simulación síncrona a una asíncrona no generó otros cambios en los atractores generados. Notemos que los atractores de punto fijo no son modificados por la asincronía. Esto se debe a que en este tipo de atractores el valor de todos los nodos de la red se mantiene sin cambios del tiempo t al tiempo $t+1$. Por lo tanto, aunque se actualice uno, algunos o todos los nodos simultáneamente, el estado se mantendrá igual a lo largo del tiempo, y este atractor se va a mantener en la red sin importar el método de actualización que se utilice. Lo que sí puede cambiar en atractores de punto fijo entre distintos métodos de actualización es el tiempo que tarda la red en llegar a ellos y sus cuencas de atracción. Por este motivo todos los atractores de punto fijo producidos en la modalidad síncrona se mantuvieron al simular los modelos con asincronía en los 1905 modelos.

Dado que los dos atractores esperados en esta red son de punto fijo, los cuales se mantienen independientemente del tipo de actualización usada, la actualización síncrona fue la más apropiada para este modelo al requerir menor tiempo de búsqueda. Por lo que, a pesar de haberse confirmado como una mejor representación de varios sistemas biológicos (Saadatpour *et al.*, 2010), la actualización asíncrona no fue necesaria más que para la simulación de mutantes, donde se requirió de ella para mostrar que los atractores cíclicos generados eran artefactos de la sincronía.

5.1.3. Modelado discreto de sistemas continuos

En el modelaje de sistemas usando un enfoque binario, como es el caso en las redes booleanas, se debe decidir en qué momento las variables se encuentran presentes o ausentes y por lo tanto cuándo es que el sistema deja de estar en un estado y pasa a otro (Thomas, 1973). La mayoría de los genes con un papel en la polaridad aB-aD poseen una expresión notoriamente polar, con una alta transcripción en el lado que promueven y nula en el que no, lo que permite separar a las células del primordio foliar en dos grupos discretos: aBaxial y aDaxial, y distinguir fácilmente el valor de dichos genes dependiendo de su expresión. Pero se ha observado que los genes *YABI* y *REV* mantienen una expresión a ambos lados del primordio foliar en etapas tempranas del desarrollo, para posteriormente restringirse al lado aB y aD respectivamente, conforme éste va madurando (Eshed *et al.*, 2001; Heisler *et al.*, 2005). Es debido a esto que se decidió permitir tanto la expresión como la ausencia de dichos genes en ambos atractores esperados, generando atractores que pueden ser representados por más de un estado de la red. A los nodos *YABI* y *REV* se les llamó nodos indefinidos para el atractor aDaxial y aBaxial respectivamente al poder ser 0 o 1 en dicho atractor, por lo tanto no son importantes para decidir si dicho atractor se cumple o no.

Los nodos indefinidos resolvieron el problema de representar la expresión continua de un gen de forma discreta, pero también requirieron de ajustes en las simulaciones de mutantes y los análisis de robustez:

Dado que una misma simulación de una mutante podría cumplir con los tipos celulares conservados o eliminados experimentalmente, pero no con el cambio en la expresión de un gen no mutado, se dividieron las reglas de cumplimiento de mutantes en dos tipos: reglas de expresión, que se cumplen dependiendo del estado específico de un nodo en los atractores obtenidos, y reglas de atractores, que requieren que se elimine o conserve uno o más atractores esperados para ser cumplidas.

En los análisis de robustez, las perturbaciones podrían generar un cambio en el valor de los nodos en los atractores generados pero no necesariamente en el tipo celular que representan. Por ello se distinguieron entre las perturbaciones sin cambios en los valores exactos de cada nodo y las que mantienen a los atractores esperados sin importar que los nodos indefinidos cambien de valor. Al momento de comparar los resultados con las redes aleatorias sólo se tomó en cuenta el total de cambios en los valores de los nodos.

En 1866 de los 1905 modelos generados por *Griffin* se obtuvieron los estados tardíos de cada atractor con *YABI* apagado en el aD y *REV* en el aB, en donde se representa la expresión que acaban teniendo estos dos genes en el primordio foliar después de sus primeras etapas de desarrollo. Además, en 3 de las 4 simulaciones de mutantes que tienen los dos tipos de reglas de cumplimiento, la mayoría de los modelos cumplen con ambas reglas. La excepción es la simulación de ganancia de función de *YABI* ($YABI=1$), donde la mayoría de los modelos no cumple con ninguno de los dos resultados, esta mutante será tratada más a detalle en la sección 5.3.3.

El que la distinción de los nodos *YABI* y *REV* en nodos indefinidos no tenga implicaciones importantes para la mayoría de los modelos podría reflejar que la expresión inicial de estos dos genes en el primordio de hoja no tiene gran importancia en el papel que desempeñan en la generación de la polaridad aB-aD, más bien su papel comienza una vez que su expresión se encuentra de forma polar. Algo similar se observó en el trabajo de Sarojam y colaboradores (2010) donde registraron que en plantas con pérdida de función de 3 o 4 genes *YABBY* se producen hojas que presentan características polares en sus primeras etapas, las cuales se pierden conforme la hoja termina de desarrollarse, sugiriendo que los genes *YABBY* no tienen un papel importante en el establecimiento inicial de la polaridad aB-aD pero sí en su mantenimiento.

5.2. Robustez en los modelos

En este trabajo se utilizará la definición de robustez de Kitano (2004), explicada como una propiedad que le permite al sistema mantener sus funciones a pesar de perturbaciones externas o internas. Aquí, la robustez de un sistema no significa que se mantenga sin cambios después de una perturbación, sino que se mantengan ciertas funcionalidades del sistema (que en este trabajo supone generar una polaridad aB-aD).

5.2.1. Baja robustez en los modelos analizados

La polaridad aB-aD en hojas es una característica fuertemente conservada en las plantas vasculares. Se presenta en numerosos clados (Kuhlemeier & Timmermans, 2016) y el patrón de expresión de varios de los genes que dan lugar a una lámina diferenciada polarmente suele estar conservado al igual que sus funciones como determinantes de esta característica, a pesar de algunos tener contribuciones distintas a la morfología final según la especie (Husbands *et al.*, 2009). Además, se ha observado que las alteraciones generadas en la polaridad aB-aD de una hoja producirán a su vez fuertes modificaciones en la morfología de ésta (Yamaguchi *et al.*, 2012). Es por ello que se considera a la polaridad aB-aD como una característica robusta y se busca que el modelaje de este trabajo también lo sea.

Haber encontrado 1905 modelos distintos que producen únicamente a los dos atractores esperados sugiere que el modelaje booleano de este trabajo es robusto. Aún así se decidió analizar a cada uno de los modelos con más mutantes cumplidas para identificar aquellos que tuvieran mayor robustez. Se encontró que dos de ellos obtuvieron la mayor cantidad de perturbaciones cuyos atractores mantuvieron los valores de los nodos sin cambios (33.3% de las perturbaciones) y también la mayor cantidad de perturbaciones cuyos atractores mantuvieron los tipos celulares aB y aD (37.5% de las perturbaciones generando únicamente a los atractores aB y aD, 54.17% de las perturbaciones generando además otros atractores).

Siguiendo la definición de robustez arriba mencionada podemos enfocarnos en las perturbaciones que generan atractores aB y aD, y por lo tanto mantienen la función del sistema, sin importar que hayan cambios en el valor de los nodos o que generen atractores nuevos diferentes a los dos deseados. A pesar de ser el porcentaje de perturbaciones más alto (54.17%), este sigue siendo menor a la robustez que esperaríamos encontrar en un modelo de polaridad aB-aD, en especial si lo comparamos con la encontrada en otros modelos de redes biológicas (Sánchez-Corrales *et al.*, 2010; Ortiz-Gutiérrez *et al.*, 2015).

Esta baja robustez podría deberse a las reducciones que se hicieron en la Red General, donde se eliminaron varios genes cuyas funciones parecen ser redundantes, principalmente con genes de su misma familia génica. Esta redundancia de funciones se ha observado en familias de los genes KANADI (Eshed *et al.*, 2001; Eshed *et al.*, 2004), *ARF3* y *ARF4* (Pekker *et al.*, 2005), la familia de los genes *PHB*, *PHV* y *REV* llamada HD-ZipIII (Emery *et al.*, 2003) y YABBY (Siegfried *et al.*, 1999; Kumaran *et al.*, 2002). Por lo tanto, descartar estos nodos de la red reduce la redundancia de funciones entre sus elementos, la cual se considera uno de los principales mecanismos que promueven la robustez de un sistema (Kitano, 2004).

En varios trabajos previos se ha documentado que varios modelos distintos generan resultados congruentes con la información experimental, pero la robustez a perturbaciones es mayor en modelos cuyas estructuras (como bucles de retroalimentación) se conforman por un mayor número de componentes comparado con los modelos con menos componentes conformando estas mismas estructuras. Ejemplos de dichos estudios son el de Morohashi y colaboradores (2002), donde estudian la regulación del ciclo celular en embriones de *Xenopus*; o el estudio de Benítez y Álvarez-Buylla (2010) donde analizan modelos de la RRG involucrada en el patrón de tricomas en la epidermis de *A. thaliana*.

De igual manera, en el presente trabajo al reducir la Red General a una RM de 6 nodos se logran generar los dos tipos celulares congruentes con la información experimental, pero se genera un

modelo más frágil a perturbaciones. Por lo tanto parece que la RM está conformada por los genes que componen al núcleo de la red responsable de la polaridad aB-aD, pero no son suficientes para entender la robustez vista en el sistema biológico bajo estudio.

5.2.2. Regulaciones no-funcionales en las redes aleatorias

En la comparación con redes aleatorias donde no se permitieron regulaciones no-funcionales, todos los modelos analizados obtuvieron una mayor robustez que la de sus redes aleatorias. En cambio, al generar redes aleatorias donde se permitieron regulaciones no-funcionales se obtuvo lo contrario: ningún modelo obtuvo mayor robustez que el promedio de sus redes aleatorias.

Todos los modelos analizados de redes aleatorias donde se permitían regulaciones no-funcionales tienen uno o más nodos cuyas regulaciones son todas no-funcionales, por lo que su regla lógica termina siendo igual a 0 ó 1. Estos nodos serán llamados nodos emancipados (nodos-ema). Se encontró que entre más redes aleatorias con nodos-ema tenga un modelo, mayor será la robustez promedio que se obtenga de sus redes aleatorias (Figura 9). Esta robustez promedio de las redes aleatorias de un modelo está determinada por el Promedio de porcentajes de las Redes Aleatorias (PRA) el cual indica el promedio de perturbaciones sin cambios en las 100 redes aleatorias del modelo (Figura 9).

Para confirmar que la causa de este resultado son los nodos-ema se seleccionaron al azar 6 redes aleatorias de diferentes modelos y en cada una se fueron convirtiendo sus nodos-ema en nodos normales, haciendo funcionales sus regulaciones. En las 6 redes analizadas ocurrió que entre más nodos-ema se modificaban se iba obteniendo una robustez cada vez menor al hacer las perturbaciones a las reglas lógicas, confirmando que estos nodos son los responsables de aumentar la robustez en las redes aleatorias.

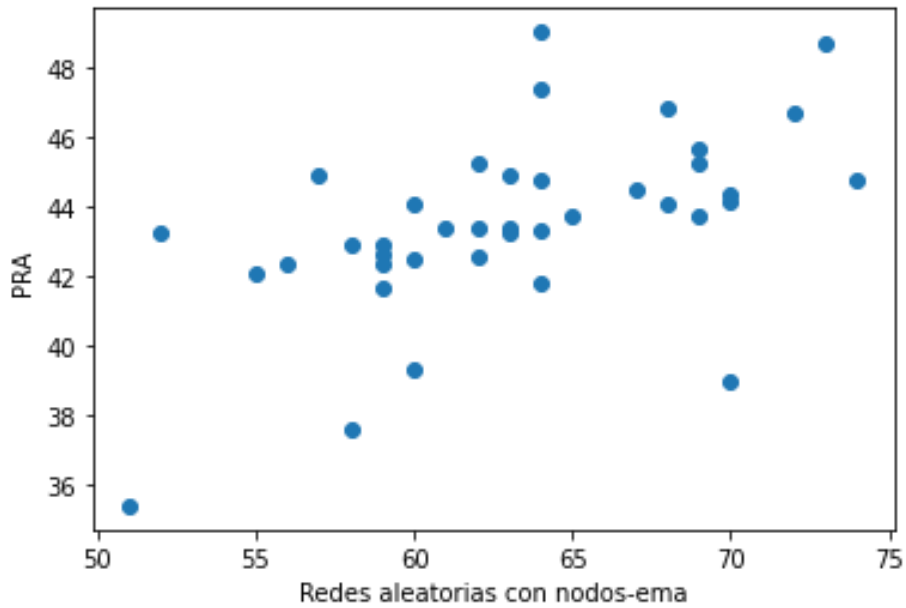


Figura 9. Correlación positiva entre el total de redes aleatorias conformadas por uno o más nodos-ema en un modelo y el PRA que éste obtenga. Cada punto de la gráfica representa un modelo de los 39 con más mutantes cumplidas.

Los nodos-ema aumentan la robustez de una red aleatoria ya que son pocas las alteraciones que modificarán sus atractores. Imaginemos una red de tres nodos con puros nodos-ema con regla=1.

Su dinámica estaría dada por:

| t | $t+1$ |
|-----|-------|
| 000 | 111 |
| 001 | 111 |
| 010 | 111 |
| 011 | 111 |
| 100 | 111 |
| 101 | 111 |
| 110 | 111 |
| 111 | 111 |

Como observamos, todos los estados iniciales llevan al único atractor posible 111. Si esta fuera una red totalmente conectada (i.e., donde todos los nodos son reguladores de todos los nodos)

habría 24 alteraciones bit-flips posibles. Sin embargo, las únicas alteraciones bit-flip posibles para generar nuevos atractores son:

| t | $t + 1$ |
|-----|---------|
| 011 | 011 |
| 101 | 101 |
| 110 | 110 |

Y las únicas alteraciones bit-flip que eliminan al atractor 111 son:

| t | $t + 1$ |
|-----|---------|
| 111 | 011 |
| 111 | 101 |
| 111 | 110 |

Es decir, el 75% de las perturbaciones no generaría cambio alguno.

5.2.3. Robustez y evolvabilidad en la polaridad aB-aD

Siguiendo la discusión del punto 2.1., al ser tan común la redundancia de funciones entre los genes responsables de la polaridad aB-aD, y al haber una baja robustez en los modelos al quitarles estas redundancias, parece que gran parte de la alta robustez que presenta la polaridad aB-aD en las plantas vasculares se puede deber a la cantidad de nodos redundantes que participan en ella. Llama la atención que dentro de los elementos genéticos que han sido registrados para esta red hay mucha más redundancia entre componentes que promueven el fenotipo aB que entre los que promueven el aD. Esto se mantiene incluso después de la reducción de la red, habiendo dos nodos promotores de aDaxialidad (*REV* y *ASI-AS2*) comparados con los cuatro para aBaxialidad (*YABI*, *ARF3*, miR165/166 y *KANI*) en la RM. Una explicación a esto podría ser la presunta señal de Sussex, la cual se propone proviene del meristemo y promueve al lado aD, que a su vez inhibirá a los factores promotores del dominio aB. Al no tener este aparente apoyo externo al meristemo, los elementos del lado aB podrían requerir de una mayor redundancia entre sí para mantener una mayor robustez.

Si vemos a las familias génicas como módulos conectados que comparten las mismas funciones pero son heterogéneos entre sí, entonces la Red General presentaría los mecanismos alternativos que Kitano (2004) nombra como una de las características que le dan robustez al sistema. Esta característica permite a los modelos mantener cierta robustez a perturbaciones, pero también podría ser la responsable de la evolvabilidad que presenta la polaridad aB-aD, siendo un sistema capaz de evolucionar si sus mutaciones pueden producir variaciones fenotípicas heredables (Wagner, 2008). La interpretación de las familias génicas como módulos de la red sugiere que éstas puedan sufrir mutaciones que generen cambios en su función o expresión, pero al tener una evolución independiente del resto de los módulos, la función principal del sistema se mantiene. Tal es el caso de los genes YABBY en algunos taxones como el maíz (*Zea mays*), donde presentan una expresión aDaxial pero se sigue manteniendo una polaridad aB-aD (Yamada *et al.*, 2011). Dado que la separación entre las regiones aBaxial y aDaxial parece tener implicaciones en el establecimiento de otras características foliares incluyendo la laminaridad y el crecimiento lateral (Sablowski *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2014), y se ha observado que las alteraciones en los mecanismos de establecimiento aB-aD causan modificaciones dramáticas en la morfología de las hojas, tales como la generación de hojas cilíndricas en ciertas monocotiledóneas, la unión del peciolo en el centro de la lámina en las hojas peltadas o el surgimiento de estructuras laminares ectópicas, por nombrar algunas (Yamaguchi *et al.*, 2012; Fukushima & Hasebe, 2014), se apoya aún más la propuesta de que estos cambios en los módulos de la red sean una fuente de evolvabilidad en el sistema, en este caso, el de generar diversidad morfológica en las hojas.

Si suponemos que cada nodo de la RM es un representante de su familia génica y por lo tanto constituye un módulo de la red, podríamos decir que esta modularidad se mantiene aún después de la reducción de la red. Posiblemente esta característica sea una de las responsables de generar

una mayor robustez en todos los modelos analizados comparada con la de sus redes aleatorias sin regulaciones no-funcionales.

Aunque a simple vista la robustez y evolvabilidad de un sistema parecen ser antagonistas, esto no necesariamente ocurre: un fenotipo puede ser producido por diferentes genotipos conectados entre sí por mutaciones simples, implicando cierto grado de robustez al haber mutaciones que mantendrán al mismo fenotipo, pero también implica evolvabilidad al haber numerosos fenotipos alcanzables por mutaciones simples, distintos al original, a partir estos mismos genotipos conectados (Wagner, 2008). Aquí saltan a la vista, una vez más, los nodos indefinidos en los atractores esperados, los cuales producen dos genotipos distintos para cada fenotipo, aportando a su vez robustez y evolvabilidad al sistema.

5.3. Implicaciones biológicas del modelo

5.3.1. Regulaciones hipotéticas

En varios estudios experimentales se ha propuesto que el establecimiento y mantenimiento de una polaridad aB-aD en el primordio ocurre gracias a regulaciones antagonistas entre los genes aBaxiales y aDaxiales (Bowman *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2011, Yamaguchi *et al.*, 2012). Esto se ve representado en la RM, donde el único tipo de regulaciones obligatorias que la conforman son represivas de nodos aB a nodos aD y viceversa. En el modelo de radio 0 conformado únicamente por dichas regulaciones obligatorias no se generan los atractores esperados. Esto sugiere que la inhibición mutua no es suficiente para generar y mantener una polaridad aB-aD. La abundante cantidad de datos actuales parece ofrecer información insuficiente para poder entender las dinámicas genéticas que subyacen a la producción de los fenotipos, paradoja declarada en numerosos estudios previos (véase Álvarez-Buylla *et al.*, 2008; La Rota *et al.*, 2011) y que también se ve reflejada en el presente estudio: a pesar de ser una característica bastante estudiada en *A. thaliana*, un organismo con numerosas mutantes analizadas,

información sobre los dominios de expresión de diversos genes (ver BAR.utoronto.ca) y cuyo genoma ha sido secuenciado en su totalidad desde hace décadas (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), la generación de polaridad aB-aD no se logra explicar con la información experimental disponible actualmente.

Fueron varias las regulaciones hipotéticas de la RM que estuvieron representadas en los modelos encontrados con *Griffin*. Estos resultados pueden indicar aquellas que parecen tener prioridad para ser estudiadas en futuros análisis experimentales. Tal es el caso de las cuatro regulaciones más repetidas en los 1905 modelos: $REV \rightarrow ASI-AS2$, $ARF3 \rightarrow KANI$, $REV \dashv KANI$ y $YABI \rightarrow KANI$. Todas ellas generan bucles de retroalimentación positivos en la RM, condición necesaria para obtener múltiples atractores de punto fijo (Thomas & d'Ari, 1990).

Resulta interesante que tres de estas regulaciones son activaciones entre nodos de un mismo lado del primordio, lo cual sugiere que además de una mutua inhibición entre los lados aB y aD, también se requiere de una activación entre genes del mismo lado para poder generar y mantener la polaridad.

Las simulaciones de mutantes y los análisis de robustez permitieron hacer una selección de los modelos que mejor explican al sistema biológico. Los dos modelos que forman parte de aquellos con más mutantes cumplidas y que obtuvieron la mayor cantidad de perturbaciones sin cambios están conformados por cuatro regulaciones hipotéticas además de las obligatorias (Figura 8 en Resultados). Dichas regulaciones hipotéticas son las mismas en ambos modelos y dicha topología de red no se presenta en ningún otro de los 1905 modelos totales obtenidos por *Griffin*.

Dentro de las regulaciones hipotéticas se encuentran las ya mencionadas $REV \rightarrow ASI-AS2$ y $REV \dashv KANI$. Las otras dos regulaciones hipotéticas son $YABI \rightarrow ASI-AS2$ y $KANI \dashv miR165/166$. Las últimas dos resultan inesperadas ya que *YABI*, *KANI* y miRNA165/166 son moléculas con expresión aB mientras que *ASI-AS2* es un gen aD. Por este

motivo son regulaciones que se salen de la hipótesis de inhibición entre genes de cada lado y activación entre genes del mismo lado, fenómeno que valdría la pena investigar más a fondo.

El nodo con una mayor centralidad de grado en estos dos modelos, es decir, con la mayor cantidad de regulaciones de entrada como de salida (Newman, 2010), es *ASI-AS2*. Este nodo es también el que posee la mayor cantidad de regulaciones obligatorias tanto en la Red General como en la RM, posiblemente debido a que representa a un dímero de dos genes distintos, sumando la información disponible de ambos en un solo nodo. Aún así podemos encontrar que este dímero tiene una importancia biológica considerable, ya que se ha encontrado que no sólo está implicado en la generación de la polaridad aB-aD, sino que también mantiene una represión constante hacia genes *KNOX* durante el desarrollo del primordio, por lo que ayuda a promover la diferenciación del primordio foliar (Husbands *et al.*, 2015). Estos resultados sugieren que el dímero *ASI-AS2* podría ser un blanco de la señal de *Sussex*, la cual proviene del meristemo y promueve la generación de células aDaxiales (*Sussex*, 1951; Reinhardt *et al.*, 2005).

En resumen, los resultados presentes sugieren que la mutua inhibición entre genes de cada lado no es suficiente para generar y mantener una polaridad aB-aD en el primordio de hoja; también se requiere de una activación entre genes del mismo lado. Además, las regulaciones hipotéticas *REV*→*ASI-AS2* y *REV*⊣*KANI* son unas de las predicciones esenciales de este trabajo, al encontrarse dentro de las regulaciones hipotéticas compartidas entre los dos modelos que mejor explican al sistema biológico y al ser parte de las regulaciones hipotéticas más repetidas entre todos los modelos.

5.3.2. Casos particulares: *YAB1* y *ARF3*

A pesar de no generar regulaciones obligatorias, se decidió mantener en la RM a los nodos *YAB1* y *ARF3* para examinar si sus regulaciones hipotéticas explican su importancia en el sistema biológico.

En el caso de *YABI*, más de la mitad de los modelos obtenidos en la exploración radial presentan una o las dos regulaciones hipotéticas generadas por *YABI*. Surge la duda de si la presencia de las regulaciones salientes de *YABI* en la mayoría de los modelos confirma las bases biológicas de éstas o si el mantener a *YABI* en la red hizo que dichas regulaciones fueran necesarias para poder cumplir con sus valores esperados. El hecho de que casi la mitad de los modelos obtenidos en la exploración radial no presentan ninguna de las regulaciones hipotéticas generadas por *YABI* y aún así logran generar los dos atractores esperados, indica que dichas regulaciones no son necesarias para obtener los valores esperados del gen y, además de colocar a las dos regulaciones hipotéticas de *YABI* como prioritarias para analizarse en laboratorio, sugiere que la aparente importancia biológica que presenta en la generación de la polaridad aB-aD se debe a las regulaciones que genera hacia otros genes.

En particular, vale la pena analizar a detalle la regulación de *YABI* hacia *ASI-AS2*, la cual presentó información incongruente en la literatura disponible consultada: en un trabajo se registró un aumento en la expresión de *ASI* en plantas con un incremento en la expresión de *YABI* (Bonnaccoroso *et al.*, 2012), sugiriendo una regulación positiva. Sin embargo, también se ha registrado que en dobles mutantes *yab1 yab3* la expresión de *ASI* y *AS2* aumenta ligeramente (Lin *et al.*, 2003; Bonnaccoroso *et al.*, 2012) sugiriendo una regulación negativa. Además, en otras mutantes de la familia *YABBY*, incluyendo a la mutante simple *yab1*, la triple mutante *yab1 yab3 yab5* y la mutante cuádruple *yab1 yab2 yab3 yab5*, no se detectaron cambios en la expresión de *ASI* con respecto a las plantas silvestres (Bonnaccoroso *et al.*, 2012), e incluso hay registros donde en la doble mutante *yab1 yab3* no se detecta ningún cambio en los niveles de transcripción de *ASI* (Kumaran *et al.*, 2002).

En el trabajo de La Rota y colaboradores (2011) donde se modeló la polaridad aB-aD en primordio de sépalo de *A. thaliana*, la regulación de *YABI* a *ASI* no fue mantenida en ninguna de sus soluciones encontradas. Sin embargo, se propuso que dicha regulación es una activación

que ocurre únicamente en las etapas tempranas del primordio de sépalo donde se ha observado una co-expresión de ambos genes, y una vez que el primordio se sigue desarrollando dicha regulación deja de ocurrir, ya sea por el cambio en la expresión de los genes o por la actividad de un tercer factor. Contrario a los resultados de La Rota y colaboradores (2011), en el trabajo actual esta regulación se presentó en numerosos modelos, incluyendo los dos con mayor robustez. En todos los casos se presentó como una regulación de activación a pesar de haberse definido de signo desconocido y por lo tanto tener la posibilidad de presentarse como una inhibición. Esto concuerda con La Rota y colaboradores (2011) y la definición de *YABI* como un activador por Bonnaccoroso y colaboradores (2012). La presencia de la regulación de activación de *YABI* a *ASI-AS2* podría deberse a la condición de nodo indefinido de *YABI*, la cual permite su expresión en el atractor aD, donde se encuentra activo *ASI-AS2*. Los resultados de este trabajo parecen confirmar la activación de *YABI* a *ASI-AS2* e incluso respaldar la hipótesis de La Rota y colaboradores (2011) que sugiere que la regulación deja de ser importante debido al cambio en la expresión de ambos genes hacia el lado aB y aD, respectivamente, pues al permitir la expresión de *YABI* en ambos atractores y no tener necesariamente dicho cambio en los modelos la expresión se logra mantener.

En contraste con *YABI*, el nodo *ARF3* se mantuvo como nodo output en los dos modelos con mayor robustez. Este no fue el caso para la mayoría de los modelos obtenidos, pues en 1233 de los 1905 modelos se presentó al menos una regulación hipotética de *ARF3*, pero únicamente dos de dichos modelos se encontraron dentro de los que cumplieron con más mutantes, ambos con una baja robustez a perturbaciones. Es posible que estos resultados se deban a la ausencia de auxina y tasiARF en la RM, los dos principales reguladores de *ARF3*: el aumento en los niveles de Auxina es necesario para la activación de los genes ARF (Tiwari *et al.*, 2003), mientras que el small RNA tasiR-ARF reprime post-transcripcionalmente la expresión de *ARF3* (Chitwood *et al.*, 2009). Por lo tanto, el modelaje de este trabajo no respalda las regulaciones

que se propone genera el gen *ARF3*, al menos dentro de los elementos de la RM. Aún así vale la pena profundizar sobre el tipo de regulación que presenta este gen ya que los genes de la familia ARF han sido considerados como represores que se activan en presencia de auxina (Tiwari *et al.*, 2003), por lo que resulta interesante que en todos los modelos donde una o ambas regulaciones de signo desconocido de *ARF3* estuvieron presentes, lo hicieron como regulaciones de activación a pesar de también tener la opción de ser inhibitorias. De hecho, se ha propuesto que *ARF3* promueve la transcripción de *YABI*; dicha regulación de activación se presentó en 458 modelos, e incluso se ha anotado un sitio de unión de *ARF3* en el promotor de *YABI* (García *et al.*, 2006), pero aún no hay evidencia experimental suficiente para confirmar que ARF3 funge como activador además de represor o si dicha regulación ocurre de forma indirecta por la represión de un tercer elemento aún desconocido.

5.3.3. Simulaciones de mutantes que no satisfacen la información experimental

La simulación de la doble mutante $KANI=1$ y $ARF3=0$ requiere mantener ambos tipos celulares aB y aD para cumplir con su regla de tipo celular, lo cual implica una contradicción entre los valores de los nodos mutados que se deben mantener siempre iguales (*KANI* siempre en 1, *ARF3* siempre en 0) y los valores que se requieren de dichos nodos para obtener ambos atractores (*KANI* en 0 para aDaxial, *ARF3* en 1 para aBaxial). Por lo que ninguno de los 1905 modelos cumplió con dicha simulación. Una posible razón de esta contradicción es que la interpretación que se le dió en este trabajo a la información experimental haya sido incorrecta. Se ha registrado que en la mutante de pérdida de función de *ARF3* se recuperan varias características de las hojas que se habían perdido en un contexto de expresión ectópica de *KANI*, incluyendo la laminaridad (Pekker *et al.*, 2005). Esta información experimental se interpretó como una recuperación de la polaridad aB-aD en dicha mutante, ya que la generación de laminaridad en las hojas requiere de la presencia de ambos lados aB y aD (Waites & Hudson,

1995; Yamaguchi *et al.*, 2012; Nakata & Okada, 2013). Pero, aunque la pérdida de función de *ARF3* recupera características perdidas por la expresión ectópica de *KANI*, no se regresa a una hoja idéntica a la de tipo silvestre (Pekker *et al.*, 2005). Debido a esto la interpretación de una recuperación de ambos lados (aB y aD) en la mutante pudo haber sido incorrecta y haber generando la contradicción actual. Aún así valdría la pena volver a analizar experimentalmente los resultados de esta mutante además de buscar moléculas o interacciones que no estén en el modelo actual y puedan ser las responsables de este resultado. Si la interpretación de la información experimental es correcta, este resultado podría sugerir que *KANI* y *ARF3* deberían ser nodos indefinidos al igual que *YABI* y *REV*.

La simulación de la mutante de ganancia de función de *YABI* requiere que *REV* se encuentre prendido en todos los atractores para ser cumplida. Aunque esta mutante se cumplió en algunos modelos, ninguno de los 39 modelos con más mutantes cumplidas logró satisfacerla. Dado que el resultado experimental de donde se originó esta simulación muestra un aumento muy ligero en la expresión de *REV* cuando *YABI* se expresa de forma ectópica (Liu *et al.*, 2011), podríamos suponer que este aumento no es significativamente mayor al encontrado en una planta de tipo silvestre y por lo tanto los 39 modelos con más mutantes cumplidas obtuvieron un resultado correcto al no cumplir con la regla de expresión de esta simulación.

5.3.4. Señal de Sussex

Como se ha mencionado antes, parece haber una señal proveniente del meristemo que promueve la aDaxialidad en las células, mientras que aquellas que no la reciben se tornarán en células aBaxiales (Sussex, 1951; Reinhardt *et al.*, 2005). Se ha propuesto a la hormona Auxina como candidata para ser esta señal de Sussex (Heisler *et al.*, 2005). En el intento de incorporar el nodo aux a la RM usando las regulaciones de los dos modelos con mayor robustez se obtuvo que las únicas regulaciones generadas por aux fueron aquellas hacia sí mismo y hacia *ARF3*, el cual es

un nodo output en los dos modelos usados. Por lo tanto, la incorporación de aux en la RM no generó ningún cambio importante en la dinámica de la red. Aunque los resultados sugieren que la Auxina no es la señal de Sussex, lo más probable es que, una vez más, los nodos y regulaciones que conforman a la RM descrita aquí no son suficientes para explicar al sistema biológico.

El haber incluido al nodo aux con todas las regulaciones hipotéticas de la RM (y no sólo las obtenidas en los dos modelos más robustos), incluso siendo un nodo input, podría haber generado un resultado distinto. Otro posible ensayo para incluir a la auxina se podría hacer mediante la definición de condiciones generales. Ambos posibles análisis serían útiles para seguir analizando la red obtenida en el presente trabajo.

5.3.5. Limitaciones del modelo

Como ya se ha dicho, la RM presenta una fuerte limitación al perder redundancia de funciones entre sus elementos debido a las reducciones que la formaron. Además, arriba ya se ha hablado de las ventajas y desventajas que presentan los modelos discretos (como las redes booleanas usadas en este trabajo) sobre los modelos continuos.

Pero es importante también dejar en claro los supuestos que hace el modelo estudiado y tener en cuenta las limitaciones que presenta:

Primero, el modelo no toma en cuenta los factores externos a la red que también están involucrados en la formación de polaridad en hojas. Esto incluye factores genéticos y moleculares que no se tomaron en la RM. Pero también factores no moleculares que se ha visto tienen una participación en esta característica, como la elasticidad de la pared celular (Qi *et al.*, 2017) o respuestas a factores ambientales como la respuesta a sombra (Bou-Torrent *et al.*, 2012). Por ello no hay que perder de vista que las características fenotípicas, incluyendo la polaridad aB-aD, son reguladas a múltiples escalas y no únicamente a nivel genético.

Además, los modelos de RRG presentan varias limitaciones al ser tomados como modelos dinámicos determinísticos. Por ejemplo, se ha visto que la actividad de varios FT es contexto-dependiente, cosa que no es tomada en cuenta por los modelos actuales de RRG (Niklas *et al.*, 2015).

Al fin y al cabo, no hay que perder de vista que los modelos no son la realidad, son abstracciones de ella que, aunque nos permiten entender mejor los fenómenos estudiados, para ello deben dejar importantes propiedades sin tomar en cuenta (Gilbert *et al.*, 2018).

5.4. Perspectivas a futuro

Con el fin de profundizar en los resultados descritos, valdría la pena agregar a la red aquellos nodos que se decidieron sacar en las reducciones, observando si se presentan cambios en su robustez, en las regulaciones hipotéticas presentes y la importancia de ciertos nodos en el sistema, particularmente de *ARF3*. Además de volver a analizar el posible papel de la Auxina como la señal de Sussex. También resultaría interesante analizar cómo se comportaría la red en otras etapas de desarrollo de la hoja (particularmente después de que se haya establecido la polaridad en el primordio y la mayoría de los genes de la red comienzan a reducir su expresión), qué cambios tendría en otros órganos laterales de la planta incluyendo órganos laminares que no necesariamente se encuentren polarizados, como son los estambres laminares en algunas especies del Orden Zingiberales (Almeida *et al.*, 2015), e incluso en otras especies, incluyendo aquellas que tienen cambios en la expresión de ciertos genes, como *YAB1* y *YAB5*, cuya expresión es aDaxial en algunas especies de la familia Poaceae incluyendo a *Z. mays* (Yamada *et al.*, 2011), o aquellas especies con hojas unifaciales cuya polaridad aB-aD se ve disminuida o incluso ausente (Tsukaya, 2014). Además, es importante resaltar que en este trabajo se investigó a la red genética responsable de la polaridad aB-aD sin tomar en cuenta todas las redes genéticas que parecen interactuar con ella, incluyendo aquellas implicadas en la diferenciación

de tipos de tejidos en cada lado de la lámina foliar de Arabidopsis, la formación y mantenimiento del meristemo apical (McConnell & Barton, 1998; Bowman *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2013), el crecimiento laminar (Sablowski *et al.*, 2015), la respuesta a la sombra (Bou-Torrent *et al.*, 2012; Merelo *et al.*, 2017) y otros mecanismos de crecimiento como la morfología del margen de la hoja (Husbands *et al.*, 2015), el desarrollo de la vasculatura (Eshed *et al.*, 2001) y mecanismos de defensa (Chapman & Carrington, 2007), por citar algunos ejemplos. Estudiar la relación que hay entre ellas así como la forma en la que se afectan entre sí es indispensable para un mejor entendimiento del desarrollo foliar.

6. Conclusiones

La red presentada en este trabajo representa un primer trabajo de integración y análisis de la información experimental disponible hasta el momento sobre la red de regulación genética involucrada en la generación de polaridad aBaxial-aDaxial en el primordio de hoja de *A. thaliana*. Se obtuvo una red general conformada por 21 nodos (genes, microRNAs y hormonas) y una red mínima conformada por 6 nodos. Se encontraron 1905 redes booleanas que satisfacen las regulaciones de la red mínima y generan únicamente a los atractores aBaxial y aDaxial. De éstas, 2 redes nos permiten entender la mayor cantidad de mutantes conocidas experimentalmente y obtienen la mayor robustez a perturbaciones. La robustez fue menor a la esperada para un modelo de polaridad abaxial-adaxial, indicando que los genes y regulaciones de la red mínima son suficientes para explicar la generación de polaridad abaxial-adaxial en el primordio de hoja, pero no para aportar la robustez vista en el sistema biológico. Los resultados del presente trabajo sugieren que, además de la mutua inhibición entre genes de cada lado del primordio foliar, también se podría requerir de activación entre genes del mismo lado para generar y mantener una polaridad aB-aD. Unas de las principales predicciones esenciales de este trabajo son las regulaciones $REV \rightarrow ASI-AS2$ y $REV \dashv KANI$, las cuales están presentes en los modelos que mejor explican al sistema biológico y que además forman parte de las regulaciones hipotéticas más repetidas. Se propone a dichas regulaciones como prioritarias para ser estudiadas en futuros análisis experimentales. A pesar de ser la polaridad aB-aD una característica sumamente estudiada, en especial en *A. thaliana*, el análisis de la información disponible usando herramientas integrativas como los modelos de redes dinámicas confirmó que existen huecos en la información experimental actual y ésta no es suficiente para explicar la generación de polaridad. Es por ello que un trabajo en conjunto de análisis experimentales y herramientas integrativas de información es indispensable para poder entender a los sistemas biológicos.

7. Referencias

- Aldana, M., Balleza, E., Kauffman, S., & Resendiz, O. (2007). Robustness and evolvability in genetic regulatory networks. *Journal of Theoretical Biology*, 245(3), 433–448.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M., & Carrington, J. C. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 121(2), 207–221.
- Alvarez-Buylla, E. R., Balleza, E., Benítez, M., Espinosa-Soto, C., & Padilla-Longoria, P. (2008). Gene regulatory network models: a dynamic and integrative approach to development. *SEB Experimental Biology Series*, 61(February), 113–139.
- Alvarez-Buylla, E. R., Benítez, M., Dávila, E. B., Chaos, Á., Espinosa-Soto, C., & Padilla-Longoria, P. (2007). Gene regulatory network models for plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(1), 83–91.
- Almeida, A. M. R., Yockteng, R., & Specht, C. D. (2015). Evolution of petaloidy in the Zingiberales: an assessment of the relationship between ultrastructure and gene expression patterns. *Developmental Dynamics*, 244(9), 1121–1132.
- Azpeitia, E., Benítez, M., Padilla-Longoria, P., Espinosa-Soto, C., & Alvarez-Buylla, E. R. (2011). Dynamic network-based epistasis analysis: Boolean examples. *Frontiers in Plant Science*, 2(December), 1–12.
- Beerling, D. J., Osborne, C. P., & Chaloner, W. G. (2001). Evolution of leaf-form in land plants linked to atmospheric CO₂ decline in the Late Palaeozoic era. *Nature*, 410(6826), 352–354.

- Benítez, M., & Alvarez-Buylla, E. R. (2010). Dynamic-module redundancy confers robustness to the gene regulatory network involved in hair patterning of *Arabidopsis* epidermis. *BioSystems*, 102(1), 11–15.
- Boer, D. R., Freire-Rios, A., Van Den Berg, W. A. M., Saaki, T., Manfield, I. W., Kepinski, S., ... Coll, M. (2014). Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors. *Cell*, 156(3), 577–589.
- Bonaccorso, O., Lee, J. E., Puaah, L., Scutt, C. P., & Golz, J. F. (2012). FILAMENTOUS FLOWER controls lateral organ development by acting as both an activator and a repressor. *BMC Plant Biology*, 12, 176.
- Bou-Torrent, J., Salla-Martret, M., Brandt, R., Musielak, T., Palauqui, J.-C., Martínez-García, J. F., & Wenkel, S. (2012). ATHB4 and HAT3, two class II HD-ZIP transcription factors, control leaf development in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), 1382–1387.
- Bowman, J. L., Eshed, Y., & Baum, S. F. (2002). Establishment of polarity in angiosperm lateral organs. *Trends in Genetics*, 18(3), 134–141.
- Brandt, R., Salla-Martret, M., Bou-Torrent, J., Musielak, T., Stahl, M., Lanz, C., Ott, F., Schmid, M., Greb, T., Schwarz, M., Choi, S. B., Barton, M. K., Reinhart, B. J., Liu, T., Quint, M., Palauqui, J. C., Martínez-García, J. F., & Wenkel, S. (2012). Genome-wide binding-site analysis of REVOLUTA reveals a link between leaf patterning and light-mediated growth responses. *Plant Journal*, 72(1), 31–42.
- Braybrook, S. A., & Kuhlemeier, C. (2010). How a plant builds leaves. *Plant Cell*, 22(4), 1006–1018.

- Byrne, M. E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J. M., Dunham, M., Hudson, a, & Martienssen, R. a. (2000). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature*, 408(6815), 967–971.
- Cao, X., Yang, H., Shang, C., Ma, S., Liu, L., & Cheng, J. (2019). The roles of auxin biosynthesis YUCCA gene family in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 8–10.
- Chapman, E. J., & Carrington, J. C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics*, 8(11), 884–896.
- Cheng, Y., Dai, X., & Zhao, Y. (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes and Development*, 20(13), 1790–1799.
- Chitwood, D. H., Guo, M., Nogueira, F. T. S., & Timmermans, M. C. P. (2007). Establishing leaf polarity: the role of small RNAs and positional signals in the shoot apex. *Development*, 134(5), 813–823.
- Chitwood, D. H., Nogueira, F. T. S., Howell, M. D., Montgomery, T. A., Carrington, J. C., & Timmermans, M. C. P. (2009). Pattern formation via small RNA mobility. *Genes and Development*, 23(5), 549–554.
- Conklin, P. A., Strable, J., Li, S., & Scanlon, M. J. (2019). On the mechanisms of development in monocot and eudicot leaves. *New Phytologist*, 221(2), 706–724.
- Cronk, Q. (2009). *The molecular organography of plants*. 1ra ed. Oxford: Oxford University Press.
- Dkhar, J., & Pareek, A. (2014). What determines a leaf's shape? *EvoDevo*, 5(1).

- Emery, J. F., Floyd, S. K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N. P., Izhaki, A., Baum, S. F., & Bowman, J. L. (2003). Radial Patterning of Arabidopsis Shoots by Class III HD-ZIP and KANADI Genes. *Current Biology*, 13(20), 1768–1774.
- Eshed, Y., Baum, S. F., & Bowman, J. L. (1999). Distinct Mechanisms Promote Polarity Establishment in Carpels of Arabidopsis, 99, 199–209.
- Eshed, Y., Baum, S. F., Perea, J. V, & Bowman, J. L. (2001). Establishment of polarity in lateral organs of plants. *Current Biology*, 11, 1251–1260.
- Eshed, Y., Izhaki, A., Baum, S. F., Floyd, S. K., & Bowman, J. L. (2004). Asymmetric leaf development and blade expansion in Arabidopsis are mediated by KANADI and YABBY activities. *Development*, 131(12), 2997–3006.
- Espinosa-Soto, C., Padilla-Longoria, P., & Alvarez-Buylla, E. R. (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(11), 2923–2939.
- Evert, F. R. (2006). *Esau's Plant Anatomy*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Fu, Y., Xu, L., Xu, B., Yang, L., Ling, Q., Wang, H., & Huang, H. (2007). Genetic interactions between leaf polarity-controlling genes and ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 in Arabidopsis leaf patterning. *Plant and Cell Physiology*, 48(5), 724–735.
- Fukushima, K., & Hasebe, M. (2014). Adaxial-abaxial polarity: The developmental basis of leaf shape diversity. *Genesis*, 52(1), 1–18.
- Furutani, M., Vernoux, T., Traas, J., Kato, T., Tasaka, M., & Aida, M. (2004). PIN-FORMED1 and PINOID regulate boundary formation and cotyledon development in Arabidopsis embryogenesis. *Development*, 131(20), 5021–5030. <https://doi.org/10.1242/dev.01388>

- Garcia, D., Collier, S. A., Byrne, M. E., & Martienssen, R. A. (2006). Specification of Leaf Polarity in *Arabidopsis* via the trans-Acting siRNA Pathway. *Current Biology*, 16(9), 933–938.
- García-Gómez, M. L., Azpeitia, E., & Álvarez-Buylla, E. R. (2017). A dynamic genetic-hormonal regulatory network model explains multiple cellular behaviors of the root apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. In *PLoS Computational Biology* (Vol. 13, Issue 4).
- Gifford, E. M., Foster, A. S. (1989). *Morphology and evolution of vascular plants*. 3ra ed. Nueva York: W. H. Freeman and Company
- Gilbert, S. F. (2018). Achilles and the tortoise: Some caveats to mathematical modeling in biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 137, 37–45.
- Goethe, J. W. (2009). *The metamorphosis of plants*. Cambridge: Massachusetts Institute of Technology.
- Guilfoyle, T. J., & Hagen, G. (2007). Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(5), 453–460.
- Harvey, I., & Bossomaier, T. (1997). Time out of joint: Attractors in asynchronous random boolean networks. *Proceedings of the Fourth European Conference on Artificial Life*, 67–75.
- Hay, A., Kaur, H., Phillips, A., Hedden, P., Hake, S., & Tsiantis, M. (2002). The gibberellin pathway mediates *KNOTTED1*-type homeobox function in plants with different body plans. *Current Biology*, 12(18), 1557–1565.
- Hay, A., Barkoulas, M., & Tsiantis, M. (2006). *ASYMMETRIC LEAVES1* and auxin activities converge to repress *BREVIPEDICELLUS* expression and promote leaf development in *Arabidopsis*. *Development*, 133(20), 3955–3961.

- Heisler, M. G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G. V., Long, J. A., & Meyerowitz, E. M. (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Current Biology*, 15(21), 1899–1911.
- Huang, T., Harrar, Y., Lin, C., Reinhart, B., Newell, N. R., Talavera-Rauh, F., Hokin, S. A., Barton, M. K., & Kerstetter, R. A. (2014). *Arabidopsis* KANADI1 Acts as a Transcriptional Repressor by Interacting with a Specific cis-Element and Regulates Auxin Biosynthesis, Transport, and Signaling in Opposition to HD-ZIPIII Factors. *The Plant Cell*, 26(1), 246–262.
- Husbands, A. Y., Chitwood, D. H., Plavskin, Y., & Timmermans, M. C. P. (2009). Signals and prepatterns: New insights into organ polarity in plants. *Genes and Development*, 23(17), 1986–1997.
- Husbands, A. Y., Timmermans, M. C. P., Nogueira, F. T. S., Benkovics, A. H., & Lodha, M. (2015). The ASYMMETRIC LEAVES Complex Employs Multiple Modes of Regulation to Affect Adaxial-Abaxial Patterning and Leaf Complexity. *The Plant Cell*, 27(12), 3321–3335.
- Husbands, A. Y., Aggarwal, V., Ha, T., & Timmermans, M. C. P. (2016). In Planta Single-Molecule Pull-Down Reveals Tetrameric Stoichiometry of HD-ZIPIII:LITTLE ZIPPER Complexes. *The Plant Cell*, 28(8), 1783–1794.
- Ilegems, M., Douet, V., Meylan-Bettex, M., Uyttewaal, M., Brand, L., Bowman, J. L., & Stieger, P. A. (2010). Interplay of auxin, KANADI and Class III HD-ZIP transcription factors in vascular tissue formation. *Development*, 137(6), 975–984.
- Itoh, J. I., Sato, Y., & Nagato, Y. (2008). The shoot organization2 gene coordinates leaf domain development along the central-marginal axis in rice. *Plant and Cell Physiology*, 49(8), 1226–1236.

- Iwakawa, H., Iwasaki, M., Kojima, S., Ueno, Y., Soma, T., Tanaka, H., ... Machida, C. (2007). Expression of the *ASYMMETRIC LEAVES2* gene in the adaxial domain of *Arabidopsis* leaves represses cell proliferation in this domain and is critical for the development of properly expanded leaves. *Plant Journal*, 51(2), 173–184.
- Iwasaki, M., Takahashi, H., Iwakawa, H., Nakagawa, A., Ishikawa, T., Tanaka, H., Matsumura, Y., Pekker, I., Eshed, Y., Vial-Pradel, S., Ito, T., Watanabe, Y., Ueno, Y., Fukazawa, H., Kojima, S., Machida, Y., & Machida, C. (2013). Dual regulation of *ETTIN* (*ARF3*) gene expression by *AS1-AS2*, which maintains the DNA methylation level, is involved in stabilization of leaf adaxial-abaxial partitioning in *Arabidopsis*. *Development*, 140(9), 1958–1969.
- Izhaki, A., & Bowman, J. L. (2007). *KANADI* and Class III HD-Zip Gene Families Regulate Embryo Patterning and Modulate Auxin Flow during Embryogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 19(2), 495–508.
- Jia, X., Ding, N., Fan, W., Yan, J., Gu, Y., Tang, X., Li, R., & Tang, G. (2015). Functional plasticity of miR165/166 in plant development revealed by small tandem target mimic. *Plant Science*, 233, 11–21.
- Kauffman, S. A. (1969). Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *Journal of Theoretical Biology*, 22(3), 437–467.
- Kelley, D. R., Arreola, A., Gallagher, T. L., & Gasser, C. S. (2012). *ETTIN* (*ARF3*) physically interacts with *KANADI* proteins to form a functional complex essential for integument development and polarity determination in *Arabidopsis*, 1109, 1105–1109.
- Kidner, C. A., & Martienssen, R. A. (2004). Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through *ARGONAUTE1*. *Nature*, 428(6978), 81–84.

- Kidner, C. A., & Martienssen, R. A. (2005). The role of ARGONAUTE1 (AGO1) in meristem formation and identity. *Developmental Biology*, 280(2), 504–517.
- Kim, Y.-S., Kim, S.-G., Lee, M., Lee, I., Park, H.-Y., Seo, P. J., ... Park, C.-M. (2008). HD-ZIP III Activity Is Modulated by Competitive Inhibitors via a Feedback Loop in Arabidopsis Shoot Apical Meristem Development. *The Plant Cell Online*, 20(4), 920–933.
- Kitano, H. (2004). Biological robustness. *Nature Reviews Genetics*, 5(11), 826–837.
- Kuhlemeier, C., & Timmermans, M. C. P. (2016). The Sussex signal: insights into leaf dorsiventrality. *Development*, 143(18), 3230–3237.
- Kuhlemeier, C. (2017). Phyllotaxis. *Current Biology*, 27(17), R882–R887.
- Kumaran, M. K., Bowman, J. L., & Sundaresan, V. (2002). YABBY Polarity Genes Mediate the Repression of KNOX Homeobox Genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14(11), 2761–2770.
- La Rota, C., Chopard, J., Das, P., Paindavoine, S., Rozier, F., Farcot, E., ... Moneger, F. (2011). A Data-Driven Integrative Model of Sepal Primordium Polarity in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23(12), 4318–4333.
- Li, H., Xu, L., Wang, H., Yuan, Z., Cao, X., Yang, Z., ... Huang, H. (2005). The Putative RNA-Dependent RNA Polymerase RDR6 Acts Synergistically with ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 to Repress BREVIPEDICELLUS and MicroRNA165 / 166 in Arabidopsis Leaf Development, 17(August), 2157–2171.
- Li, J. F., Bush, J., Xiong, Y., Li, L., & McCormack, M. (2011). Large-scale protein-protein interaction analysis in Arabidopsis mesophyll protoplasts by split firefly luciferase complementation. *PLoS ONE*, 6(11).

- Lin, W., Shuai, B., & Springer, P. S. (2003). The Arabidopsis LATERAL ORGAN BOUNDARIES –Domain Gene ASYMMETRIC LEAVES2 Functions in the Repression of KNOX Gene Expression and in Adaxial-Abaxial Patterning. *The Plant Cell*, 15(October), 2241–2252.
- Liu, Q., Yao, X., Pi, L., Wang, H., Cui, X., & Huang, H. (2009). The ARGONAUTE10 gene modulates shoot apical meristem maintenance and establishment of leaf polarity by repressing miR165/166 in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 58(1), 27–40.
- Liu, Z., Jia, L., Wang, H., & He, Y. (2011). HYL1 regulates the balance between adaxial and abaxial identity for leaf flattening via miRNA-mediated pathways. *Journal of Experimental Botany*, 62(12), 4367–4381.
- Luong, T. Q., Keta, S., Asai, T., Kojima, S., Nakagawa, A., Micol, J. L., ... Machida, C. (2018). A genetic link between epigenetic repressor AS1 – AS2 and DNA replication factors in establishment of adaxial – abaxial leaf polarity of Arabidopsis, 49, 39–49.
- Lynn, K., Fernandez, a, Aida, M., Sedbrook, J., Tasaka, M., Masson, P., & Barton, M. K. (1999). The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in Arabidopsis development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development (Cambridge, England)*, 126(3), 469–481.
- Mallory, A. C., & Vaucheret, H. (2009). ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO Reports*, 10(5), 521–526.
- McConnell, J. R., & Barton, M. K. (1998). Leaf polarity and meristem formation in Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)*, 125(15), 2935–2942.
- Merelo, P., Xie, Y., Brand, L., Ott, F., Weigel, D., Bowman, J. L., & Marcus, G. (2013). Genome-Wide Identification of KANADI1 Target Genes. 8(10), 1–14.

- Merelo, P., Ram, H., Pia Caggiano, M., Ohno, C., Ott, F., Straub, D., Graeff, M., Cho, S. K., Yang, S. W., Wenkel, S., & Heisler, M. G. (2016). Regulation of MIR165/166 by class II and class III homeodomain leucine zipper proteins establishes leaf polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(42), 11973–11978.
- Merelo, P., Paredes, E. B., Heisler, M. G., & Wenkel, S. (2017). The shady side of leaf development: the role of the REVOLUTA/KANADI1 module in leaf patterning and auxin-mediated growth promotion. *Current Opinion in Plant Biology*, 35, 111–116.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., ... Qi, Y. (2008). Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell*, 133(1), 116–127.
- Morohashi, M., Winn, A. E., Borisuk, M. T., Bolouri, H., Doyle, J., & Kitano, H. (2002). Robustness as a measure of plausibility in models of biochemical networks. *Journal of Theoretical Biology*, 216(1), 19–30.
- Muñoz, S., Carrillo, M., Azpeitia, E., & Rosenblueth, D. A. (2018). Griffin: A tool for symbolic inference of synchronous boolean molecular networks. *Frontiers in Genetics*, 9(39).
- Müssel, C., Hopfensitz, M., Kestler, H. A. (2010). BoolNet -- an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics*, 26(10):1378-1380.
- Nakata, M., & Okada, K. (2013). The Leaf Adaxial-Abaxial Boundary and Lamina Growth. *Plants*, 2(2), 174–202.
- Nemhauser, J. L. (2018). Back to basics: what is the function of an Aux/IAA in auxin response? *New Phytologist*, 218(4), 1295–1297.

- Newman, K. L., Fernandez, A. G., & Barton, M. K. (2002). Regulation of Axis Determinacy by the Arabidopsis PINHEAD Gene. *The Plant Cell*, 14(December), 3029–3042.
- Newman, M. (2010). *Networks an Introduction*. 1ra ed. Nueva York: Oxford University Press Inc.
- Niklas, K. J., Bondos, S. E., Dunker, A. K., & Newman, S. A. (2015). Rethinking gene regulatory networks in light of alternative splicing, intrinsically disordered protein domains, and post-translational modifications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(February), 1–13.
- Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J. L., & Hake, S. (2000). Mechanisms that control knox gene expression in the Arabidopsis shoot. *Development (Cambridge, England)*, 127(24), 5523–5532.
- Ortiz-Gutiérrez, E., García-Cruz, K., Azpeitia, E., Castillo, A., de la Paz Sánchez, M., & Álvarez-Buylla, E. R. (2015). A Dynamic Gene Regulatory Network Model That Recovers the Cyclic Behavior of Arabidopsis thaliana Cell Cycle. *PLoS Computational Biology*, 11(9), 1–28.
- Pekker, I., Alvarez, J. P., & Eshed, Y. (2005). Auxin Response Factors Mediate Arabidopsis Organ Asymmetry via Modulation of KANADI Activity. 17(November), 2899–2910.
- Pfluger, J., & Zambryski, P. (2004). The role of SEUSS in auxin response and floral organ patterning. *Development*, 131(19), 4697–4707.
- Piazza, P., Jasinski, S., & Tsiantis, M. (2005). Evolution of leaf developmental mechanisms. *New Phytologist*, 167(3), 693–710.
- Qi, J., Wang, Y., Yu, T., Cunha, A., Wu, B., Vernoux, T., Meyerowitz, E., & Jiao, Y. (2014). Auxin depletion from leaf primordia contributes to organ patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(52), 18769–18774.

- Qi, J., Wu, B., Feng, S., Lü, S., Guan, C., Zhang, X., ... Jiao, Y. (2017). Mechanical regulation of organ asymmetry in leaves. *Nature Plants*, 3(9), 724–733.
- Rast, M. I., & Simon, R. (2012). Arabidopsis JAGGED LATERAL ORGANS Acts with ASYMMETRIC LEAVES2 to Coordinate KNOX and PIN Expression in Shoot and Root Meristems. *The Plant Cell*, 24(7), 2917–2933.
- Reinhardt, D., Frenz, M., Mandel, T., & Kuhlemeier, C. (2005). Microsurgical and laser ablation analysis of leaf positioning and dorsoventral patterning in tomato, 1.
- Reinhart, B. J., Liu, T., Newell, N. R., Magnani, E., Huang, T., Kerstetter, R., Michaels, S., & Barton, M. K. (2013). Establishing a Framework for the Ad / Abaxial Regulatory Network of Arabidopsis : Ascertaining Targets of Class III HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER and KANADI Regulation. 25(11), 3228–3249.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). Prediction of Plant MicroRNA Targets, 110, 513–520.
- Rodriguez, R. E., Debernardi, J. M., & Palatnik, J. F. (2013). Morphogenesis of simple leaves: Regulation of leaf size and shape. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 3(1), 41–57.
- Rosenblueth, D. A., Muñoz, S., Carrillo, M., & Azpeitia, E. (2014). Inference of Boolean Networks from Gene Interaction Graphs Using a SAT Solver. *Algorithms for Computational Biology*, 235–246.
- Saadatpour, A., & Albert, R. (2013). Boolean modeling of biological regulatory networks: A methodology tutorial. *Methods*, 62(1), 3–12.

- Saadatpour, A., Albert, I., & Albert, R. (2010). Attractor analysis of asynchronous Boolean models of signal transduction networks. *Journal of Theoretical Biology*, 266(4), 641–656.
- Sablowski, R. (2015). Control of patterning, growth, and differentiation by floral organ identity genes. *Journal of Experimental Botany*, 66(4), 1065–1073.
- Sánchez-Corrales, Y. E., Álvarez-Buylla, E. R., & Mendoza, L. (2010). The *Arabidopsis thaliana* flower organ specification gene regulatory network determines a robust differentiation process. *Journal of Theoretical Biology*, 264(3), 971–983.
- Sarojam, R., Sappl, P. G., Goldshmidt, A., Efroni, I., Floyd, S. K., Eshed, Y., & Bowman, J. L. (2010). Differentiating *Arabidopsis* Shoots from Leaves by Combined YABBY Activities. *The Plant Cell Online*, 22(7), 2113–2130.
- Siegfried, K. R., Eshed, Y., Baum, S. F., Otsuga, D., Drews, G. N., & Bowman, J. L. (1999). Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development (Cambridge, England)*, 126(18), 4117–4128.
- Simpson, Michael G. (2010). *Plant Systematics*, 2nd edition, Academic Press.
- Sussex, I. M. (1951). Experiments on the cause of dorsiventrality in Leaves. *Nature*.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408.
- Thieme, C. J., Rojas-Triana, M., Stecyk, E., Schudoma, C., Zhang, W., Yang, L., Minãmbres, M., Walther, D., Schulze, W. X., Paz-Ares, J., Scheible, W. R., & Kragler, F. (2015). Endogenous *Arabidopsis* messenger RNAs transported to distant tissues. *Nature Plants*, 1(March).

- Thomas, R. (1973). Boolean formalization of genetic control circuits. *Journal of Theoretical Biology*, 42(3), 563–585.
- Thomas, R., & D’Ari, R. (1990). *Biological Feedback*. CRC Press.
- Tiwari, S. B., Hage, G., & Guilfoyle, T. (2003). The Roles of Auxin Response Factor Domains in Auxin-Responsive Transcription. *The Plant Cell*, 15, 533–543.
- Trigg, S. A., Garza, R. M., MacWilliams, A., Nery, J. R., Bartlett, A., Castanon, R., Goubil, A., Feeney, J., O’Malley, R., Huang, S. S. C., Zhang, Z. Z., Galli, M., & Ecker, J. R. (2017). CrY2H-seq: A massively multiplexed assay for deep-coverage interactome mapping. *Nature Methods*, 14(8), 819–825.
- Tsukaya, H. (2014). Comparative leaf development in angiosperms. *Current Opinion in Plant Biology*, 17(1), 103–109.
- Ueno, Y., Ishikawa, T., Watanabe, K., Terakura, S., Iwakawa, H., Okada, K., ... Machida, Y. (2007). Histone Deacetylases and ASYMMETRIC LEAVES2 Are Involved in the Establishment of Polarity in Leaves of Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 19(2), 445–457.
- Van Rossum, G. (2020). *The Python Library Reference*, release 3.8.2. Python Software Foundation.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P., & Bartel, D. P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development, 1187–1197.
- Wagner, A. (2008). Robustness and evolvability: A paradox resolved. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1630), 91–100.

- Waites, R., & Hudson, A. (1995). *phantastica*: A gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development*, 121(7), 2143–2154.
- Wenkel, S., Emery, J., Hou, B.-H., Evans, M. M. S., & Barton, M. K. (2007). A Feedback Regulatory Module Formed by LITTLE ZIPPER and HD-ZIPIII Genes. *The Plant Cell Online*, 19(11), 3379–3390.
- Wu, G., Lin, W.-C., Huang, T., Poethig, R. S., Springer, P. S., & Kerstetter, R. a. (2008). KANADI1 regulates adaxial-abaxial polarity in Arabidopsis by directly repressing the transcription of ASYMMETRIC LEAVES2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(42), 16392–16397.
- Xu, L., Xu, Y., Dong, A., Sun, Y., Pi, L., Xu, Y., & Huang, H. (2003). Novel *as1* and *as2* defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 and ERECTA functions in specifying leaf adaxial identity, 4097–4107.
- Yamada, T., Yokota, S., Hirayama, Y., Imaichi, R., Kato, M., & Gasser, C. S. (2011). Ancestral expression patterns and evolutionary diversification of YABBY genes in angiosperms. *Plant Journal*, 67(1), 26–36.
- Yamaguchi, T., Nukazuka, A., & Tsukaya, H. (2012). Leaf adaxial-abaxial polarity specification and lamina outgrowth: Evolution and development. *Plant and Cell Physiology*, 53(7), 1180–1194.
- Yu, T., Guan, C., Wang, J., Sajjad, M., Ma, L., & Jiao, Y. (2017). Dynamic patterns of gene expression during leaf initiation. *Journal of Genetics and Genomics*, 44(12), 599–601.
- Zañudo, J. G. T., & Albert, R. (2013). An effective network reduction approach to find the dynamical repertoire of discrete dynamic networks. *Chaos*, 23(2).

- Zhang, X., Yuan, Y., Pei, Y., Lin, S., Tuschl, T., & Patel, D. J. (2006). suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes and Development*, 3255–3268.
- Zhong, R., & Ye, Z. H. (2001). Alteration of auxin polar transport in the Arabidopsis *ifl1* mutants. *Plant Physiology*, 126(2), 549–563.
- Zhou, G. K., Kubo, M., Zhong, R., Demura, T., & Ye, Z. H. (2007). Overexpression of miR165 affects apical meristem formation, organ polarity establishment and vascular development in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 48(3), 391–404.
- Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S. H., Liou, L. W., ... Zhang, X. (2011). Arabidopsis *argonaute10* specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell*, 145(2), 242–256.

Anexo

Cuadro A1, Anexo. Interacciones de la Red General y sus pruebas experimentales.

La columna Interacción señala el gen causante, el signo de la interacción (--l : negativa, --> :positiva, --? : signo desconocido) y el gen blanco. La columna Tipo de Interacción señala si la interacción forma parte del grupo de interacciones Obligatorias o Hipotéticas. En el caso de las interacciones Obligatorias se señala si la interacción es directa (el gen causante se une físicamente al gen blanco) o indirecta.

| Interacción | Tipo de Interacción | Interacción directa o indirecta | Pruebas experimentales |
|-------------------------------|---------------------|---------------------------------|--|
| AGO1 — miR165/166 | Obligatoria | Interacción directa | miR165 se expresa ectópicamente en el dominio aBaxial de plantas mutantes ago1 (Kidner y Martienssen et al., 2004). Sobreexpresión de miR165 genera un fenotipo similar al de mutantes de pérdida de función ago1 (Zhou et al., 2007). Se observa coimmunoprecipitación entre AGO1 y miR165 (Zhang et al., 2006) |
| AS1-AS2 — ARF3 | Obligatoria | Interacción directa | Mutantes simples as1 y as2 tienen una sobreexpresión de ARF3 (Iwasaki et al., 2013; Iwakawa et al., 2007). Mutantes con sobreexpresión de AS2 tienen una reducción en niveles de ARF3. AS1 se une a la región río arriba (upstream) de la región codificante de ARF3. AS2 promueve la expresión de miR390, un promotor de tasiARF, por lo que la represión de AS1 y AS2 a ARF3 y ARF4 también es indirecta. Las anomalías en mutantes as2 se suprimen ligeramente por la introducción de mutaciones en arf3 y arf4, y son completamente suprimidas por una doble mutación arf3 arf4. Lo mismo con anomalías en mutantes as1, lo que sugiere que algunas anomalías en mutantes as1 y as2 son resultado de sobreexpresión de ARF3 y ARF4 (Iwasaki et al., 2013) |

Cuadro A1, Anexo. Continuación

| | | | |
|---------------------------------|-------------|---|--|
| AS1-AS2 — miR165/166 | Obligatoria | Interacción directa | MIR155A posee un sitio de unión para AS1-AS2, al ser eliminado se genera una expresión ectópica de miR166. Niveles de transcripción de MIR166A aumentan significativamente el mutante de pérdida de función as2, además de expresarse ectópicamente en la capa epidérmica aBaxial y aDaxial del primordio de hoja. (Husbands et al., 2015). En expresión ectópica de AS2 hay una reducción en la expresión de miR165 (Ueno et al., 2007) |
| AS1-AS2 — YAB1 | Obligatoria | Interacción directa a partir de hipótesis informada | En mutantes de pérdida de función de as2 aumenta la expresión de YAB1 (Luong et al., 2018; Xu et al., 2003; Li et al., 2005; Fu et al., 2007). En mutantes con sobreexpresión de AS2 se reducen los niveles de transcripción de YAB1 (Lin et al., 2003). Al haber una interacción negativa directa confirmada de AS1-AS2 a YAB5 (Husbands et al., 2015) y al ser YAB5 un gen de la misma familia que YAB1, se conjetura que esta interacción directa también ocurre hacia YAB1 |
| AS1-AS2 — YAB5 | Obligatoria | Interacción directa | En mutantes as1 y as2 los niveles de transcripción de YAB5 aumentan significativamente (Husbands et al., 2015; Luong et al., 2018; Iwakawa et al., 2007) AS1-AS2 reprime a YAB5 al unirse directamente a su región promotora y guiar a PRC2, el cual deposita una marca de represión de cromatina y cataliza su trimetilación (Husbands et al., 2015). |
| Aux — Aux/IAA | Obligatoria | Interacción directa | El aumento en los niveles de auxina promueve la degradación de las proteínas Aux/IAA (Guilfoyle & Hagen, 2007; Nemhauser, 2018) |
| Aux/IAA — ARF3 | Obligatoria | Interacción directa | Las proteínas Aux/IAA reprimen la actividad transcripcional de los genes de la familia ARF, por lo que el aumento en la concentración de auxina promueve la activación de ARF3 por medio de la degradación de Aux/IAA (Tiwarei et al., 2003; Pekker et al., 2005; Nemhauser, 2018). El tratamiento con NPA (un inhibidor de la transportación de auxina) en el gineceo de una planta tipo silvestre fenocopia al mutante de pérdida de función arf3 (Pluger y Zambryski, 2004) |

Cuadro A1, Anexo. Continuación

| | | | |
|--|--------------------|---|---|
| <p>KAN1 — AS1-AS2</p> | <p>Obligatoria</p> | <p>Interacción directa</p> | <p>Los niveles de AS2 se ven reducidos al inducir a KAN1 (Reinhart et al., 2013) Sobreexpresión de KAN1 reduce los niveles del mRNA AS2 en hojas y tallos. Pérdida de función de KAN1 tiene una expresión ectópica de AS2 en lados abaxial y adaxial del primordio de hoja. KAN1 es un represor directo de AS2 (Wu et al., 2008).</p> |
| <p>KAN1 — aux</p> | <p>Obligatoria</p> | <p>Interacción indirecta</p> | <p>KAN1 reprime directamente varios genes involucrados en el transporte y señalización de auxina como PIN4 y FLS2 (Huang et al., 2014) Embriones con expresión ectópica de KAN1 tienen una disminución en PIN1 y DR5rev, dos elementos necesarios para el transporte intercelular y la respuesta a auxina respectivamente (Illegems et al., 2010) Expresión ectópica de KAN1 reprime a TAA1 y YUC5, dos elementos de la ruta de producción de auxina triptófano-dependiente, lo que genera bajos niveles de auxina (Merelo et al., 2017). Los efectos de la expresión ectópica de KAN1 se ven reducidos con una expresión ectópica de PIN1 (Illegems et al., 2010)</p> |
| <p>miR165/166 y AGO1 — REV</p> | <p>Obligatoria</p> | <p>Interacción directa. Esta interacción se vuelve miR165/166 — REV en la Red Mínima</p> | <p>MIR165 y 166 tienen complementariedad con la región codificante START de los mRNA de la clase HD-Zip III, de la que forma parte REV. Un cDNA de REV con sustituciones en esta región genera un fenotipo similar a la ganancia de función de REV (Emery et al., 2003). En una planta con sobreexpresión de MIR165 (35S::MIR165) hay una reducción en la expresión de PHB y REV en las hojas (Li et al., 2005). Sobreexpresión de miR165 genera una reducción drástica en los niveles de transcripción de los cinco genes de la familia HD-ZipIII en Arabidopsis (Zhou et al., 2007). miR165 y 166 requieren unirse al complejo RISC conformado por AGO1 para poder unirse al mRNA de su gen blanco (Liu et al., 2011)</p> |

Cuadro A1, Anexo. Continuación

| | | | |
|--|--------------------|------------------------------|---|
| <p>miR165/166 y AGO1 — PHB</p> | <p>Obligatoria</p> | <p>Interacción directa</p> | <p>MIR165 y 166 tienen complementariedad con la región codificante START de los mRNA de la clase HD-Zip III, de la que forma parte PHB (Emery et al., 2003). En una planta con sobreexpresión de MIR165 (35S::MIR165) hay una reducción en la expresión de PHB y REV en las hojas (Li et al., 2005; Zhou et al., 2007; Illegems et al., 2010). miR165 y 166 requieren unirse al complejo RISC conformado por AGO1 para poder unirse al mRNA de su gen blanco (Liu et al., 2011)</p> |
| <p>miR165/166 y AGO1 — PHV</p> | <p>Obligatoria</p> | <p>Interacción directa</p> | <p>Sobreexpresión de miR165 genera una reducción drástica en los niveles de transcripción de los cinco genes de la familia HD-ZipIII en Arabidopsis (Zhou et al., 2007; Illegems et al., 2010). miR165 y 166 requieren unirse al complejo RISC conformado por AGO1 para poder unirse al mRNA de su gen blanco (Liu et al., 2011)</p> |
| <p>AGO1 → miR168</p> | <p>Obligatoria</p> | <p>Interacción directa</p> | <p>miR168 requiere unirse al complejo RISC conformado por AGO1 para poder apagar al mRNA de su gen blanco (Mi et al., 2008)</p> |
| <p>miR168 — AGO1</p> | <p>Obligatoria</p> | <p>Interacción directa</p> | <p>El mRNA de AGO1 es complementario con miR168, sólo con tres desajustes o mismatches (Rhoades et al., 2002) Al eliminar la zona de complementariedad con miR168 en AGO1 se genera un aumento en la acumulación del mRNA de AGO1 y hay defectos en el desarrollo de la planta. Estos defectos se rescatan al generar las mismas mutaciones en miR168, volviendolos códigos complementarios de nuevo (Vaucheret et al., 2004; Mallory y Vaucheret, 2009)</p> |
| <p>REV → aux</p> | <p>Obligatoria</p> | <p>Interacción indirecta</p> | <p>Expresión ectópica de REV promueve a TAA1 y YUC5, dos elementos de la ruta de producción de auxina triptófano-dependiente, lo que genera un aumento en los niveles de auxina (Merelo et al., 2017). REV se une directamente a los genes TAA1 y YUC5 (Brandt et al., 2012) Los transportadores de auxina PIN1 y PIN2 se expresan en bajos niveles y se reduce el transporte de auxina en mutantes con pérdida de función de REV. Varias características fenotípicas de la mutante por pérdida de función de REV se pueden copiar con la introducción de un inhibidor de transporte de auxina (Zhong y Ye, 2001)</p> |

Cuadro A1, Anexo. Continuación

| | | | |
|--------------------------------|-------------|---------------------|--|
| REV — miR165/166 | Obligatoria | Interacción directa | REV interactúa físicamente con las proteínas HAT3 y ATHB4 y juntas reprimen directamente a MIR165/166, uniéndose cerca del sitio de transcripción (Merelo et al., 2016) |
| STM — AS1-AS2 | Obligatoria | Interacción directa | En plantas de tipo silvestre AS1 está ausente en SAM, pero en mutantes <i>stm</i> se observa una expresión de AS1 en meristemos (Byrne et al., 2000) AS1 y AS2 son reguladas negativamente por STM (Byrne et al., 2002) |
| tARF — ARF3 | Obligatoria | Interacción directa | En mutantes con reducción en la expresión de tasiRNA hay una sobreexpresión de ARF3 y ARF4. Además, ARF3 y ARF4 tienen una región de complementariedad hacia TAS3, la secuencia no codificante de tasiARF, la cual ha sido validada como un sitio de unión (Allen et al., 2005). |
| tARF — ARF4 | Obligatoria | Interacción directa | En mutantes con reducción en la expresión de tasiRNA hay una sobreexpresión de ARF3 y ARF4. Además, ARF3 y ARF4 tienen una región de complementariedad hacia TAS3, la secuencia no codificante de tasiARF, la cual ha sido validada como un sitio de unión (Allen et al., 2005). |
| AGO10 — miR165/166 | Obligatoria | Interacción directa | AGO10 se une por inmunoprecipitación a miR165/166. Los defectos en el SAM de mutantes <i>ago10</i> son rescatados al secuestrar la expresión de miR165/166 en el nicho de expresión AGO10 (Zhu et al., 2011). En mutantes <i>ago10</i> hay un aumento en los niveles de miR165/166 en hojas y meristemos. Los fenotipos aberrantes de mutantes <i>ago10</i> son parcialmente rescatados al reducir los niveles de miR165/166 en hojas y meristemos (Liu et al., 2009) |
| ZPR1-4 — REV | Obligatoria | Interacción directa | Sobreexpresión de ZPR1 y ZPR3 genera plantas con fenotipos similares a las mutantes de genes de la familia HD-ZipIII, de la que forma parte REV. Las proteínas ZPR1-4 se unen físicamente al motivo cremallera de leucina de la proteína HD-ZipIII, formando heterodímeros y evitando que se unan a sus DNA blancos (Wenkel et al., 2007; Kim et al., 2008; Husbands et al., 2016) |

Cuadro A1, Anexo. Continuación

| | | | |
|--|-------------|---------------------|---|
| ZPR1-4 — PHB | Obligatoria | Interacción directa | Sobreexpresión de ZPR1 y ZPR3 genera plantas con fenotipos similares a las mutantes de genes de la familia HD-ZipIII. Las proteínas ZPR1-4 se unen físicamente al motivo cremallera de leucina de la proteína HD-ZipIII, formando heterodímeros y evitando que se unan a sus DNA blancos (Wenkel et al., 2007; Kim et al., 2008; Husbands et al., 2016) |
| ARF3 —? YAB1 | Hipotética | - | Un doble híbrido en levadura indica una interacción directa de las proteínas YAB1 y ARF3 (Trigg et al., 2017). Hay una zona de unión de ARF3 (Auxine Response Element, AuxRE) en el promotor de YAB1, indicando una unión y activación o represión directa de ARF3 a YAB1, se sugiere que sea una activación ya que en la triple mutante as1 ago7 arf3 se observa una reducción en los niveles de FIL en comparación con la doble mutante as1 ago7 (García et al., 2006). Aunque se ha observado que ARF3 funge como represor en presencia de auxina al unirse al gen cuyo promotor tiene un AuxRE (Tiwari et al., 2003), por lo que la relación podría ser de represión |
| REV —> ZPR1-4 | Hipotética | - | Los niveles de transcripción de los cuatro ZPR (ZPR1-4) aumentan en respuesta a la activación de la proteína REV. En la triple mutante de ganancia de función phb phv rev hay un aumento en los niveles de transcripción de ZPR1-4 (Wenkel et al., 2007) |
| AGO1 y AGO10 — > STM | Hipotética | - | En doble mutante ago1 ago10 hay una disminución en la expresión de STM (Lynn et al., 1999). Plantas con expresión ectópica de AGO10 en el lado abaxial de la hoja genera meristemas ectópicos, posiblemente por una expresión ectópica de STM (Newman et al., 2002) |
| ARF3 —? REV | Hipotética | - | El código promotor de REV posee un AuxRE, por lo que podría haber una interacción directa de un ARF a REV (Itoh et al., 2008) |
| ARF3 —> KAN1-4 | Hipotética | - | Mutantes con expresión ectópica de genes KAN generan abaxialización, pero estos fenotipos se pierden en un contexto de pérdida de ARF3. Todos los aspectos de la pérdida de función de genes KAN se observan en la doble mutante arf3 arf4 (Pekker et al., 2005) ARF3 se une directamente con genes KAN (Kelley et al., 2012) |

Cuadro A1, Anexo. Continuación

| | | | |
|-----------------------------|------------|---|---|
| ARF3 — ARF3 | Hipotética | - | ARF3 parece actuar junto con genes KAN para reprimir a la proteína PIN1 encargada del traslado intercelular (Izhaki y Bowman, 2007), lo que reprimiría el flujo de auxina, la cual se requiere para la activación de ARF3 |
| ARF4 —> ARF4 | Hipotética | - | Se ha observado una homodimerización de ARF4 (Li et al., 2011; Boer et al., 2014). Es posible que haya una activación directa de ARF4 por otro ARF al haber presencia de AuxRE en su promotor (Overvoorde et al., 2005 y Yoon et al., 2009 citados por La Rota et al., 2011) |
| AS1-AS2 — ? aux | Hipotética | - | En mutantes as2 la actividad del transportador de auxina PIN1 persiste en la hoja por más tiempo que en plantas tipo silvestre (Husbands et al., 2015). En mutantes as2 hay un decaimiento en la expresión de los transportadores de auxina PIN1 y PIN7, pero no se observa un cambio en la expresión de auxina por medio de su reportero DR5rev en embriones (Rast y Simon, 2012) |
| AS1-AS2 — KAN1 | Hipotética | - | En mutantes de pérdida de función de AS2 se observa una expresión ectópica de KAN1 y KAN2 (Wu et al., 2008; Luong et al., 2018). En mutantes con ganancia de función de AS2 la expresión de KAN1 es excluida del primordio de hoja y de la hoja adulta (Wu et al., 2008; Lin et al., 2003) |
| aux —> aux | Hipotética | - | La familia de genes YUCCA codifican enzimas que son clave en la síntesis de auxinas en Arabidopsis. Además parece que auxina induce a YUC4 (Cheng et a., 2006; Cao et al., 2019) |
| aux —> REV | Hipotética | | El tratamiento con auxina genera un aumento en la expresión de REV en plántulas (Zhou et al., 2007) |
| aux — STM | Hipotética | - | En doble mutante pin1 pid (dos genes promotores del transporte de auxina) la expresión de STM se expande en embrión (Furutani et al., 2004). En plantas con reducción en el tranposrte o señalamiento de auxina hay una expresión ectópica del gen BP, el cual forma parte de la misma familia génica de STM (Hay et al., 2006) |

Cuadro A1, Anexo. Continuación

| | | | |
|-------------------------------|------------|---|--|
| KAN1 — KAN1 | Hipotética | - | Basado en experimentos ChIP parece que KAN1 se une a su propio promotor y al de KAN2 (Merelo et al., 2013). En expresión ectópica de KAN1 los niveles de expresión de KAN1 aumentan (Ilegems et al., 2010). |
| KAN1 — KAN2 | Hipotética | - | Basado en experimentos ChIP parece que KAN1 se une a su propio promotor y al de KAN2 (Merelo et al., 2013). La expresión de KAN2 se reduce en respuesta a una inducción de KAN1 (Reinhart et al., 2013) |
| KAN1 — miR165/166 | Hipotética | - | Por medio de un análisis de ChIP se observa que KAN1 se une directamente a MIR166. En sobreexpresión de KAN1 hay una disminución de MIR166 (Merelo et al., 2013) |
| KAN1-3 — > YAB1 | Hipotética | - | En doble mutante kan1 kan2 hay una disminución en la expresión de YAB1 (Eshed et al., 2001). En plantas con expresión ectópica de KAN2 se observa una expresión ectópica de YAB1 en el primordio de hojas (Eshed et al., 2004). |
| KAN1-3 — > YAB3 | Hipotética | - | En triple mutante kan1 kan2 kan3 se pierde expresión de YAB3 en hojas (Eshed et al., 2004) |
| KAN1-3 — PHB | Hipotética | - | En triple mutante kan1 kan2 kan3 hay una expresión ectópica de PHB en el primordio de hoja. En plantas con expresión ectópica de KAN2 no se detecta expresión de PHB en el primordio de hoja (Eshed et al., 2004; Ilegems et al., 2010) |
| KAN1-3 — PHV | Hipotética | - | En doble mutante kan1 kan2 hay mayores niveles de expresión de PHV (Eshed et al., 2001). En plantas con expresión ectópica de KAN1 se genera una disminución en la expresión de PHV (Ilegems et al., 2010) |
| KAN1-3 — REV | Hipotética | - | En doble mutante kan1 kan2 hay una expansión de la expresión de REV (Eshed et al., 2001). Mutantes con pérdida de función de genes KAN tienen defectos similares a mutantes con ganancia de función de REV (Emery et al., 2003). En plantas con expresión ectópica de KAN1 se genera una disminución en la expresión de REV (Ilegems et al., 2010) |

Cuadro A1, Anexo. Continuación

| | | | |
|----------------------------------|--|---|---|
| miR165/166 —> ARF3 | Hipotética | - | Los niveles de expresión de ARF3 y ARF4 aumentan con sobreexpresión de miR165 (Zhout et al., 2007) A reducir la expresión de miR165/166, los niveles de expresión de ARF3 y ARF4 se ven reducidos (Jia et al., 2015) |
| miR165/166 —> ARF4 | Hipotética *sin representar en Figura 3 Resultados | - | Los niveles de expresión de ARF3 y ARF4 aumentan con sobreexpresión de miR165 (Zhout et al., 2007) A reducir la expresión de miR165/166, los niveles de expresión de ARF3 y ARF4 se ven reducidos (Jia et al., 2015) |
| miR165/166 --? aux | Hipotética *sin representar en Figura 3 Resultados | - | En sobreexpresión de miR165 la distribución de DR5-rev, un promotor de auxina, está mucho más expandida. Esto ocurre por la formación de un exceso de células del procambium donde DR5-rev y transcritos de HD-ZipIII se acumulan (Ilegems et al., 2010). Al reducir la expresión de miR165/166 aumentan niveles de NIT2, NIT3 e IAA, moléculas relacionadas con la síntesis de aux (Jia et al., 2015) |
| REV —? ARF3 | Hipotética | - | ZIPPY, un gen promovido por REV, reduce actividad de ETT indirectamente. Pero el mRNA de ETT aumenta en respuesta a inducción de REV, contrario a lo esperado (Reinhart et al., 2013). |
| REV —> AS1-AS2 | Hipotética | - | REV podría activar indirectamente a AS1 por medio de GTE6, CKh e IPT5 (La Rota et al., 2011) |
| REV — KAN1 | Hipotética | - | Inducción de REV genera una reducción en la expresión de genes KAN (Reinhart et al., 2013). La triple mutante phb phv rev carece de simetría bilateral en el embrión, pero al disminuir la expresión de KAN1, KAN2 y KAN4 ésta se restaura (Izhaki y Bowman, 2007) |

Cuadro A1, Anexo. Continuación

| | | | |
|--|---|----------|---|
| <p>YAB --? aux</p> | <p>Hipotética *sin representar en Figura 3 Resultados</p> | <p>-</p> | <p>En mutantes de genes YABBY cambia la distribución de auxina con respecto a la planta silvestre: En doble mutante yab1 yab3 la expresión de DR5 disminuye en los primordios de hoja en comparación con los WT En mutantes de YABBY la expresión de PIN1 se expresa en la punta del primordio (donde se originará la vena central) al igual que en la planta silvestre, pero su expresión no se mantiene y deja de observarse. En WT, PIN1 se expresa en el sitio donde la venación secundaria se formará. Pero en mutantes triples y cuádruples de YABBY, PIN1 no se expresa ahí. En su lugar se expresa en sitios de la lámina donde se formarán protuberancias ectópicas. PIN1 se encuentra en el L1 del SAM en embriones, pero en mutantes YABBY no se expresa en el SAM. También se observan cambios en la expresión de auxina en embriones de mutantes de YABBY (Sarojam et al., 2010)</p> |
| <p>YAB1 → KAN1</p> | <p>Hipotética</p> | <p>-</p> | <p>Hay un aumento en la expresión de KAN1 en plantas con sobreexpresión de YAB1. En la triple mutante yab1 yab3 yab5 la expresión de KAN1 aumenta, pero en la mutante cuádruple yab1 yab2 yab3 yab5 su expresión se reduce (Bonaccorso et al., 2012).</p> |
| <p>YAB1 y 3 —? AS1- AS2</p> | <p>Hipotética</p> | <p>-</p> | <p>Expresión de AS1 aumenta en plantas con incremento en expresión de YAB1. En doble mutante yab1 yab3 la expresión de AS1 y AS2 aumenta (Bonaccorso et al., 2012). Los niveles de expresión de AS1 en hojas de la doble mutante yab1 yab3 no reflejan cambios en comparación con plantas de tipo silvestre (Kumaran et al., 2002)</p> |
| <p>YAB1-3 — STM</p> | <p>Hipotética</p> | <p>-</p> | <p>En la doble mutante yab1 yab3 se observan meristemos ectópicos en las hojas. Plantas con expresión ectópica de YAB1 fallan en producir SAMs funcionales (Siegfried et al., 1999). En mutantes simples yab1 y yab3 y en la doble mutante yab1 yab3 hay una expresión ectópica de genes de la familia KNOX a la cual pertenece STM (Kumaran et al., 2002)</p> |

Cuadro A2, Anexo. Expresión vista experimentalmente de los genes de la RM en hoja de *A. thaliana*

| Gen | Información experimental |
|------------|--|
| YAB1 | Su mRNA se detecta a través del primordio de hoja y después se confina al lado aBaxial de la hoja (Eshed 2001), lo mismo ocurre en el primordio floral y los primordios de órganos florales como el de pétalo (Franks et al., 2006). |
| ARF3 | Su expresión se localiza en el dominio aBaxial de todos los primordios de órganos laterales (Pekker et al., 2005). Tiene una fuerte expresión en el primordio joven de hoja, donde se acumula en el lado aBaxial. Mientras la hoja madura su actividad se reduce (Husbands et al., 2015) |
| miR165/166 | Se encuentran en la vasculatura y el lado aBaxial del primordio de hoja (Kidner & Martienssen et al., 2004; Husbands et al., 2015) |
| KAN1 | Muestra una expresión en el lado aBaxial del primordio de cotiledones, hojas y órganos florales (Kerstetter et al., 2001; Wu et al., 2008) |
| REV | Su expresión se observa a través de todo el primordio foliar inicial, y cuando éste se va separando del meristemo su expresión se va restringiendo al dominio aDaxial (Eshed et al., 2001). Lo mismo ocurre con el gen PHB de la misma familia (McConnell et al., 2001) |
| AS1-AS2 | Los transcritos de ambos genes se acumulan y restringen en la región aDaxial de primordios de cotiledones y hojas, pero sus niveles de expresión se reducen conforme la hoja madura (Iwakawa et al., 2007; Wu et al., 2008; Rast y Simon, 2012; Machida et al., 2015) |

Cuadro A3, Anexo. Mutantes simuladas en los modelos encontrados por *Griffin* y sus pruebas experimentales en *A. thaliana*.

| Mutante | Regla | Fundamentos experimentales |
|-------------------|-------------------------------------|--|
| YAB = 1 | REV = 1 | En plantas REV::YAB1, donde se expresa ectópicamente YAB1 bajo el control del promotor de REV, hay un ligero aumento en la expresión de REV (Liu et al., 2011). |
| YAB = 1 | Se elimina aD, se conserva aB | La epidermis adaxial de hojas en plantas con expresión constitutiva de YAB1 o YAB3 muestran tipos celulares parecidos a la epidermis abaxial de plantas de tipo silvestre (Siegfried et al., 1999). |
| ARF3 = 1 | Se conservan aD y aB | Las plantas con expresión ectópica de ARF3 no muestran diferencias con plantas de tipo silvestre (Pekker et al., 2005). |
| ARF3 = 0 | Se elimina aB, se conserva aD | Las dobles mutantes arf3 arf4 muestran una reducción en la identidad abaxial en todos los órganos laterales (Guilfoyle et al., 2007). Mutantes simples arf3 muestran una pérdida parcial de la identidad abaxial en pétalos (Pekker et al., 2005). |
| KAN1 = 1 | Se elimina aD, se conserva aB | La expresión ectópica de KAN1 convierte tejidos adaxiales en abaxiales (Eshed et al., 2001). En más de la mitad de dobles mutantes kan1 kan2 analizadas se genera una vasculatura aDaxializada en el peciolo de hoja, con el floema rodeando al xilema (Ha et al., 2007). |
| KAN1 = 0 | Se elimina aB, se conserva aD | Todos los órganos florales en dobles mutantes kan1 kan2 se encuentran casi completamente aDaxializados (Eshed et al., 2001). |
| miR165/166 = 1 | ARF3 = 1 | Los niveles de expresión de ARF3 y ARF4 aumentan con sobreexpresión de miR165 en plántulas de 1 semana (Zhou et al., 2007). |
| miR165/166 = 0 | ARF3 = 0 y AS1-AS2 = 1 | Al reducir la expresión de miR165/166, los niveles de expresión de ARF3 se ven reducidos en un 20% y se genera un aumento en la expresión de AS1/AS2 (Jia et al., 2015). |
| REV = 1 | ARF3 = 1 y YAB1 = 0 | Los niveles de mRNA de ARF3 aumentan en respuesta a una sobreexpresión de REV (Reinhart et al., 2013). En mutantes de ganancia de función de REV se reduce ligeramente la expresión de YAB1 (Liu et al., 2011). |

Cuadro A3, Anexo. Continuación

| | | |
|------------------------|-------------------------------|--|
| REV = 1 | Se elimina aB, se conserva aD | Plantas mutantes con ganancia de función de REV muestran órganos laterales aDaxializados (Emery et al., 2003). |
| REV = 0 | YAB1 = 1 | En mutantes con pérdida de función de REV aumenta ligeramente los niveles de expresión de YAB1 (Liu et al., 2011; Fu et al., 2007). |
| REV = 0 | Se elimina aD, se conserva aB | Mutantes con pérdida de función de REV muestran órganos abaxializados (Zhong y Ye, 2001). |
| AS1-AS2 = 1 | REV = 1 | En plantas 35S::AS1 y en mutantes de ganancia de función de AS2 aumentan los niveles de transcripción de REV, PHB y PHV (Fu et al., 2007). |
| AS1-AS2 = 1 | Se elimina aB, se conserva aD | Un aumento en la expresión de AS2 genera plantas con hojas aDaxializadas (Husbands et al., 2015). En plantas 35S:AS2 se generan hojas con una superficie adaxial sin cambios, pero una superficie aBaxial con una mezcla de tipos celulares abaxiales y adaxiales (Lin et al., 2003). |
| AS1-AS2 = 0 | REV = 0 | En las mutantes simples as1 y as2 se ven reducidos los niveles de transcripción de REV, PHB y PHV en hoja (Fu et al., 2007). En plantas mutantes as2 se reducen los niveles de mRNA de REV, aunque sus transcritos aún se detectan en el dominio adaxial de las hojas (Xu et al., 2006). |
| AS1-AS2 = 0 y ARF3 = 0 | YAB1 = 1 | En las mutantes triples as1 ago7 arf3 se observa una sobreexpresión de YAB1, mayor a la que se genera en las mutantes simples as1 (Garcia et al., 2006). |
| KAN1 = 1 y ARF3 = 0 | Se conservan aD y aB | Los efectos de abaxialización por expresión ectópica de KAN se pierden en una mutante <i>arf3</i> (Pekker et al., 2005) |
| KAN1 = 0 y ARF3 = 0 | Se elimina aB, se conserva aD | La triple mutante kan1 kan2 arf3 tiene el mismo fenotipo que doble mutante kan1 kan2, donde los órganos se encuentran aDaxializados (Pekker et al., 2005). |

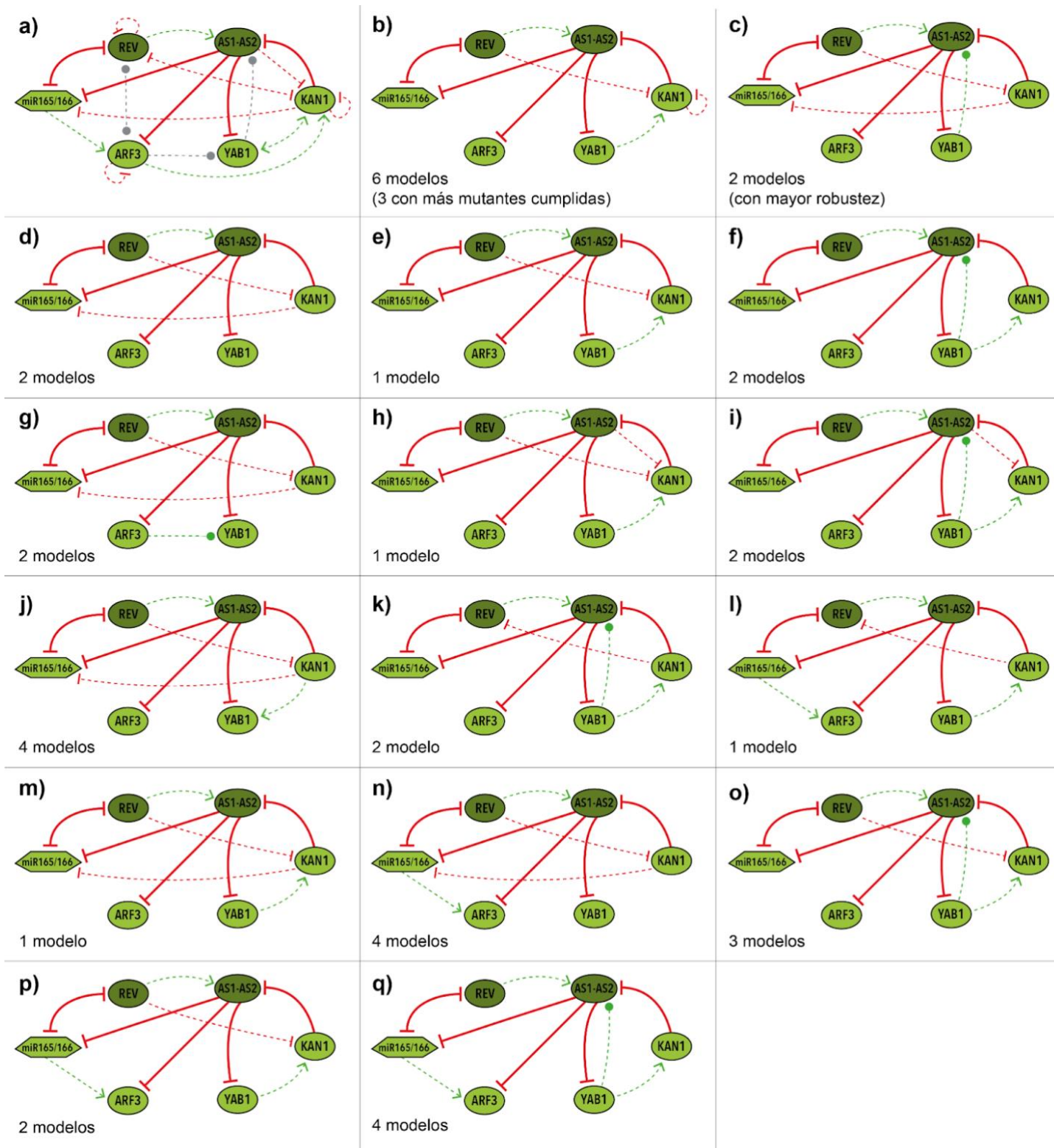


Figura A1. Gráficas de interacción de los 39 modelos con más mutantes cumplidas. **a)** Todas las regulaciones hipotéticas de la RM. **b) - q)** Gráficas de interacción de los modelos con más mutantes cumplidas. En la esquina inferior izquierda de cada gráfica se indica el total de modelos que comparten dicha gráfica. La simbología es la misma que en la Figura 3 en Resultados.