



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA**  
**DE LA COMPUTACIÓN**

**MODELACIÓN DE LA RED DE REGULACIÓN DEL FACTOR DE**  
**TRANSCRIPCIÓN PPAR $\gamma$  ASOCIADA A FIBROSIS HEPÁTICA**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:**  
**MAESTRA EN CIENCIAS (COMPUTACIÓN)**

**P R E S E N T A:**

**DIANA ELISA GARCÍA CORTÉS**

**TUTOR PRINCIPAL**  
**DR. RICARDO STRAUZS SANTIAGO**  
**INSTITUTO DE MATEMÁTICAS - UNAM**  
**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. MAYO 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



# Agradecimientos

---

Este trabajo está dedicado a las personas que han tenido una influencia importante en mi desarrollo profesional. Es fácil pensar que los logros alcanzados y las decisiones tomadas son una cosa personal, cuando en realidad, las personas que nos rodean y nuestro entorno son tremendamente responsables de nuestra formación.

Al Dr. Fernando Ramos tengo que agradecerle el haberme presentado con la biología de sistemas y las aplicaciones computacionales a la investigación en biología y genómica. Ha sido un mentor excepcional y gracias a él tengo claro mi objetivo profesional. Al Dr. Ricardo Strausz le agradezco su confianza y el haberme dado la libertad de hacer una tesis con la que me siento satisfecha. Además, me acercó a la investigación que se realiza en el Instituto de Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y ayudó a que mi maestría en la UNAM fuera una de las etapas que más he disfrutado de mi vida. Al Dr. Jesús Espinal le agradezco sus valiosos comentarios sobre mi trabajo, espero tener la oportunidad de trabajar con él en el futuro. También quiero agradecer a Conacyt por otorgarme la beca y permitir que muchos estudiantes puedan dedicarse a lo que los apasiona.

Me siento muy afortunada por la familia que tengo. Crecí con dos mujeres que me han enseñado sobre paciencia, ecuanimidad y amor: mi mamá y mi tía Cruz. Han sabido ser fuertes y guardar la calma en las situaciones difíciles, espero cada día parecerme más a ellas. Tengo la suerte también de compartir la vida con mi hermana Laura, de quien admiro sus múltiples capacidades y quien hace que mi vida esté llena de miles de colores. A mi papá y a mis amigos les agradezco el hacerme sentir siempre valorada y acompañada. De no ser por la hospitalidad de Gustavo no hubiera podido terminar este trabajo.

Finalmente tengo que agradecerle a Morgan, mi compañero en estos últimos años, porque su amor y su paciencia me han permitido crecer y ser mejor persona; lo admiro mucho y con él cada día aprendo algo nuevo. Compartimos el sentimiento de que la vida puede ser más justa y que podemos construir un mundo en el que las personas tengan la libertad de desarrollar todas sus capacidades; ese sentimiento nos impulsa a vivir con responsabilidad y a dar nuestro mayor esfuerzo en todo lo que hacemos. No podría sentirme más motivada, apoyada y amada.

Ellos y otras personas más forman una buena parte de lo que soy y me ayudan a sentirme tranquila, satisfecha y emocionada de comenzar una nueva etapa.

# Índice general

<b>Resumen</b>	<b>5</b>
<b>Parte I. Preliminares</b>	<b>7</b>
<b>Sistemas biológicos y redes Booleanas</b>	<b>8</b>
Redes Booleanas . . . . .	9
<b>Fibrosis hepática, células estelares y PPAR<math>\gamma</math></b>	<b>13</b>
Tipos celulares que participan en la fibrosis . . . . .	13
Composición de la Matriz Extracelular Hepática . . . . .	16
Reversibilidad de la fibrosis . . . . .	16
Activación de las Células Estelares Hepáticas . . . . .	17
Papel de PPAR $\gamma$ y otras moléculas anti-fibrogénicas . . . . .	27
<b>Parte II. El modelo</b>	<b>30</b>
<b>Objetivos</b>	<b>31</b>
<b>Modelos relacionados y herramientas utilizadas</b>	<b>32</b>
Modelos relacionados en la literatura . . . . .	32
Herramientas utilizadas . . . . .	34
<b>Un modelo Booleano para PPAR<math>\gamma</math> y la activación de células estelares</b>	<b>41</b>
La Gráfica . . . . .	41
Análisis dinámico de la red Booleana . . . . .	45
<b>Conclusión</b>	<b>53</b>
<b>Anexos</b>	<b>56</b>
1. Vértices en la gráfica . . . . .	56
2. Interacciones en la gráfica extendida . . . . .	58
3. Interacciones para NET-SYNTHESIS . . . . .	61
4. Reglas booleanas en la red reducida . . . . .	62
Referencias . . . . .	64

# Resumen

---

La modelación de sistemas biológicos permite establecer con especificaciones formales los mecanismos y procesos observados experimentalmente, simular de forma artificial el comportamiento de los sistemas biológicos y su respuesta a estímulos externos e investigar las perturbaciones que llevan al sistema a un comportamiento no deseado. La construcción de modelos ha sido impulsada por el desarrollo de tecnologías experimentales que obtienen datos biológicos a gran escala y por el enfoque adoptado por la biología de sistemas para analizar la estructura y dinámica de dichos modelos.

Las gráficas son empleadas constantemente para representar la estructura de sistemas biológicos, especialmente vías de señalización, redes de regulación transcripcional y vías metabólicas. Esto por la forma intuitiva en que los componentes (genes, proteínas, procesos celulares) pueden ser representados con vértices y sus relaciones, con aristas.

Para analizar la dinámica de dichos sistemas, entre los formalismos más utilizados se encuentran las redes Booleanas. Son conceptualmente simples pero capaces de capturar características importantes del comportamiento y la regulación del sistema. En una red Booleana un componente tiene dos estados: activo (implementado con el valor 1) e inactivo (valor 0). Las interacciones se denotan mediante enunciados lógicos que utilizan operadores tales como la conjunción ( $\wedge$ ), disyunción ( $\vee$ ) y la negación ( $\neg$ ). Los estados estables que alcanza la red, llamados atractores, se relacionan con características físicas y comportamientos celulares importantes en diversas condiciones experimentales.

En este trabajo se construye un modelo para representar las vías de señalización y de regulación genética principales en la activación de las células estelares hepáticas (HSCs). En el hígado sano los diferentes tipos celulares intercambian señales que permiten al órgano cumplir con sus funciones biológicas. Sin embargo, con el avance de la fibrosis las HSCs sufren cambios significativos que las convierten en células que proliferan, capaces de expresar moléculas fibrogénicas como la colágena tipo I, con un fenotipo contráctil, secretoras de sustancias que atraen células que promueven la respuesta inmune como los leucocitos y que expresan  $\alpha$ -SMA, una proteína característica de su estado activo. PPAR $\gamma$  es un receptor nuclear que actúa como factor de transcripción y se ha demostrado experimentalmente que es capaz de revertir los cambios mencionados en las HSCs.

Mediante una búsqueda en la literatura, se identificaron las interacciones principales que participan en el proceso y se construyó una gráfica que conjunta las señales pro-activación que recibe una célula estelar y la actividad de PPAR $\gamma$ . Las interacciones se tradujeron en enunciados lógicos para construir una red Booleana que fue reducida con el fin de facilitar su análisis dinámico. En la reducción se utilizaron herramientas implementadas en otros modelos Booleanos de sistemas biológicos.

Los resultados obtenidos en la búsqueda de atractores de la red y su simulación coinciden con las observaciones reportadas en la literatura. La activación constante de PPAR $\gamma$  es capaz de llevar a la red Booleana de un atractor que representa el fenotipo de activación en una célula estelar hepática hacia un atractor asociado con el fenotipo quiescente. Es decir, PPAR $\gamma$  puede contrarrestar las señales de pro-activación que recibe la célula estelar durante la fibrosis hepática.

Además, la actividad de otro componente en la red, Smad7, resultó ser de gran importancia al actuar como un switch entre un estado que representa activación parcial en las células y el estado característico de su activación. Estudios recientes indican que Smad7 está siendo investigado como potencial blanco terapéutico en la fibrosis hepática y también se investigan los mecanismos de su participación en la activación de las HSCs.

Este trabajo está organizado de la manera siguiente: en el primer capítulo se describe el enfoque utilizado por la biología de sistemas y se exponen las características principales de la modelación con redes Booleanas; en el segundo capítulo se da una explicación detallada de los procesos biológicos que participan en la fibrosis hepática, las vías de señalización más importantes en la activación de las HSCs y las interacciones reportadas experimentalmente para PPAR $\gamma$ ; en el tercer capítulo se describen modelos relacionados en la literatura, es decir, aquellos que utilizan redes Booleanas o que están relacionados con enfermedades en el hígado y se resumen los algoritmos detrás de las herramientas utilizadas para la reducción de la red y la obtención de los atractores; finalmente, en el cuarto capítulo se presentan la gráfica construida y los resultados del análisis de la dinámica del modelo.

# Parte I. Preliminares



# Sistemas biológicos y redes Booleanas

---

El desarrollo de tecnologías experimentales para obtener datos biológicos a gran escala ha impulsado la creación de modelos que permiten analizar los procesos biológicos como sistemas, con cierta estructura y dinámica, donde todos los componentes participan de forma integral. Este es el enfoque que adopta la biología de sistemas [62].

Dentro de este *Big Data* biológico encontramos datos de secuenciación del genoma completo de muchos organismos; datos de microarreglos de ADN, una tecnología que permite obtener perfiles de la actividad de los genes en una célula, es decir, su **perfil de expresión**; datos de análisis de espectrometría de masas, que cuantifican la presencia de proteínas y otros compuestos en diferentes condiciones experimentales; información de artículos en la literatura, que sirven también como una valiosa fuente de datos masivos, entre muchos otros [78]. Toda esta información se integra en diversas bases de datos que la categorizan por especie, tipo de experimento, clase de células que fueron utilizadas, condiciones relacionadas con alguna enfermedad o el uso de algún fármaco, etc. ¿Cómo se extrae conocimiento significativo sobre un sistema biológico a partir de tanta información? Para ello, la biología de sistemas requiere de técnicas computacionales y formalismos matemáticos [76].

Lo novedoso en la biología de sistemas está en el enfoque y en la posibilidad de construir modelos basados en datos experimentales de gran escala, ya que en realidad se han propuesto formalismos matemáticos para modelar procesos biológicos desde los años sesenta [21]. Según el sistema estudiado, los datos disponibles y la pregunta biológica que se realiza, es posible elegir entre un amplio espectro de formalismos de modelación que van desde altamente abstractos hasta altamente específicos.

Los modelos permiten formular nuevas hipótesis gracias a que los mecanismos observados experimentalmente son complementados con especificaciones formales; además, permiten simular de forma artificial su comportamiento y su respuesta a estímulos externos dando indicios sobre su regulación, predecir nuevas relaciones entre los componentes, investigar las perturbaciones que llevan al sistema a un comportamiento no deseado e intervenir artificialmente para restaurarlo [124].

Las gráficas son una de las representaciones más utilizadas en la biología de sistemas para entender la estructura de sistemas biológicos complejos e interactivos debido a la forma intuitiva en que los componentes que participan (es decir, los genes, proteínas, moléculas, etc.), son representados como vértices y las interacciones entre ellos, como aristas [67]. Entre los sistemas biológicos que comúnmente se representan con gráficas encontramos a las redes de regulación genética, las vías de señalización y las vías metabólicas. Éstos también son modelos que simplifican el análisis de procesos complejos, altamente relacionados y que ocurren en la célula de forma simultánea.

Las redes de regulación genética o redes de regulación transcripcional describen interacciones entre factores de transcripción y los genes que ellos regulan. Los factores de transcripción son proteínas que responden a señales biológicas y permiten que las células regulen su perfil de expresión para que así fabriquen las proteínas que necesitan en el tiempo y la cantidad adecuada [57]. Desde los inicios de la investigación en genómica existe

una urgencia por entender la regulación genética en un nivel sistémico. Una motivación es la posibilidad de aplicar técnicas de intervención en los modelos de regulación genética y simular la respuesta a tratamientos en enfermedades resultantes de regulaciones aberrantes en el genoma [124].

Las vías de señalización modelan interacciones entre proteínas y con ellas, la transmisión de información en las señales biológicas. Por su parte, las vías metabólicas modelan sucesiones de reacciones químicas catalizadas por enzimas donde uno o varios sustratos dan lugar a productos finales.

Cabe mencionar que, tanto en las representaciones de redes de regulación genética como en vías de señalización, no suele hacerse una distinción entre el gen, el RNA mensajero en el que se transcribe y la proteína que produce; todos se denotan usualmente con el símbolo oficial del gen (e.g. PPARG hace referencia al gen y a su producto, un receptor en la membrana nuclear de nombre *Peroxisome proliferator activated receptor gamma*).

Cuando se conoce el sentido de las interacciones, se utilizan gráficas dirigidas para que la dirección de la arista siga el flujo de información desde el vértice de origen al de destino. Además, las aristas pueden caracterizarse por signos, donde un signo positivo indica activación de una proteína o transcripción de un gen y un signo negativo indica inhibición en la activación o en la transcripción [21, 138].

Una vez construida la gráfica, el estudio de sus características topológicas, es decir, de su **estructura**, puede dar cuenta de diversas propiedades del proceso biológico subyacente. Por ejemplo, puede estudiarse la distribución del número de aristas adyacentes en los vértices para encontrar vértices concentradores o *hubs*; también el número de caminos entre pares de vértices para conocer qué tan redundante es la gráfica [8]. Además, a partir de una comparación entre redes de regulación de diferentes organismos, es posible establecer en qué medida partes del sistema regulatorio se han conservado evolutivamente [21]. Otro posible análisis es la búsqueda de un pequeño conjunto de patrones de regulación que se han encontrado en las redes de regulación genética, llamados *motifs*. Los *motifs* aparecen de forma más frecuente en las redes de regulación de diferentes organismos que lo se esperaría en redes aleatorias. Por lo tanto, se cree que representan una ventaja evolutiva y que actúan como bloques de construcción, donde cada *motif* lleva a cabo una función específica de procesamiento de información [13].

A su vez, el análisis de la **dinámica** del sistema otorga información sobre los cambios y el flujo de información en el proceso biológico a través del tiempo. Así puede investigarse el comportamiento del sistema bajo diversas condiciones o pueden hacerse predicciones sobre su respuesta cuando las condiciones cambian. Aunque las interacciones entre los componentes son la base para el análisis dinámico, una gráfica no es suficiente para este estudio ya que se requiere conocer la evolución en el tiempo de dichas interacciones.

Los formalismos para el análisis dinámico se dividen esencialmente en dos categorías: discretos y continuos. Se diferencian por su grado de abstracción, por las características que resaltan en los modelos y también por los datos experimentales que requieren.

## Redes Booleanas

Los modelos de dinámica discreta representan la progresión del sistema en pasos de tiempo discreto. Describen la dinámica en forma cualitativa y son utilizados para analizar redes de regulación genética y redes de señalización con muchos componentes. Además, son escalables y fáciles de implementar [96, 138].

Los modelos lógicos son un subconjunto de los modelos de dinámica discreta. Asignan

variables cualitativas con pocos valores enteros a cada componente y éstos se relacionan mediante enunciados lógicos que determinan el valor de las variables en cada paso de tiempo. Para construir un modelo lógico a partir de una gráfica se requiere información de cómo cada uno de los vértices responde a la actividad de sus vértices adyacentes de entrada [82]. Los modelos lógicos son flexibles ya que una variable puede representar casi cualquier cosa, tal como actividad genética, la presencia de una proteína o un complejo proceso celular, dependiendo del nivel de abstracción seleccionado para abordar el proceso biológico estudiado [67].

Las redes Booleanas son uno de los modelos lógicos más utilizados ya que son conceptualmente simples pero capaces de capturar características importantes del comportamiento y la regulación del sistema. Los componentes son descritos mediante variables booleanas que asumen sólo dos estados cualitativos. El valor 1 representa que el elemento está presente o activo (e.g. arriba de cierta concentración molecular), mientras que el valor 0 significa que éste se encuentra inactivo o apagado. Las interacciones entre los componentes se denotan mediante enunciados lógicos que utilizan operadores tales como la conjunción ( $\wedge$ , AND), disyunción ( $\vee$ , OR) y la negación ( $\neg$ , NOT). El **estado del sistema** es un vector de ceros y unos que describe los valores de todas las variables en un tiempo determinado [57]. La primera aplicación en biología de modelación con redes Booleanas se le acredita a Kauffman [58], quien aplicó este formalismo para analizar una red de regulación genética aleatoria.

Una red Booleana actualiza el valor de, al menos, un vértice en cada paso de tiempo y el orden en que las variables se actualizan indica un manejo implícito de las escalas de tiempo asociadas al modelo.

Diversos esquemas de actualización han sido propuestos. El esquema síncrono asume escalas de tiempo similares para todos los procesos involucrados y se implementa actualizando los valores de los vértices de forma simultánea. Los esquemas asíncronos fueron propuestos para agregar variabilidad al orden de actualización de los vértices y así representar varias escalas de tiempo. En el esquema asíncrono de orden aleatorio se selecciona una secuencia aleatoria en cada ciclo de actualización y los valores de los vértices modifican su estado en ese orden. En el esquema aleatorio general en cada paso de tiempo se actualiza solamente un vértice elegido de forma aleatoria, mientras que en el esquema asíncrono determinista se establecen unidades de tiempo de actualización para cada vértice y éstos se actualizan en múltiplos de dichas unidades [82, 96].

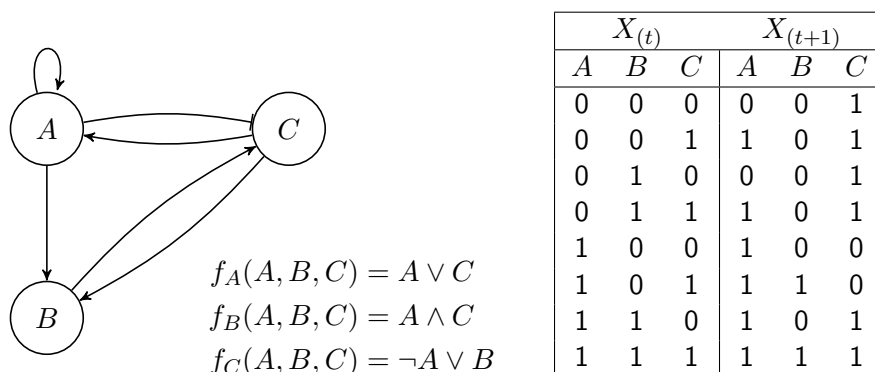


Figura 1: Representación de una red Booleana con tres variables y los enunciados lógicos que determinan sus valores. La tabla de verdad contiene todos los posibles estados del sistema al tiempo  $t$  y su actualización en el tiempo  $t + 1$  utilizando un esquema síncrono.

No hay un método de actualización óptimo; nuevamente, la elección depende de las características que quieran resaltarse en el modelo y de los datos disponibles, por ejemplo, si éstos sugieren cierta relación entre las escalas de tiempo de los procesos como para imponer restricciones en el orden o en las probabilidades de actualización de los vértices.

La figura 1 muestra la representación de una red Booleana, los enunciados lógicos asociados a cada variable y una tabla con todas las combinaciones posibles de valores para las variables en el tiempo  $t$  y su actualización al tiempo  $t + 1$  con un esquema síncrono.

Una red Booleana con un número de vértices finito tiene un **espacio de estados** también finito y si se utiliza un esquema de actualización síncrona, el modelo resultante es un modelo determinista donde el estado sucesor es único y una condición inicial converge siempre al mismo estado después de que han pasado un número determinado de pasos de tiempo. Por lo tanto, tras suficientes rondas de actualización, la red regresará a un conjunto finito de estados previamente visitados y navegará entre ellos en un orden fijo. Este conjunto es llamado **atractor** y, si está formado por un sólo estado, recibe el nombre de punto fijo, de otra forma se conoce como ciclo límite. La **cuenca de atracción** de un atractor está definida como el conjunto de todos los estados tales que, si son elegidos como el estado inicial del sistema, alcanzarán dicho atractor [21].

El espacio de estados completo y las transiciones entre éstos pueden representarse en un **diagrama de transición de estados**. Para una red Booleana con  $n$  vértices, este diagrama es la gráfica dirigida  $D(S, E)$  donde  $S$  es un conjunto de  $2^n$  vértices, cada uno representando un posible estado y  $E$  es un conjunto de  $2^n$  aristas que unen a un estado con su estado sucesor en la trayectoria de actualización de la red [124].

Las redes Booleanas pueden tener más de un atractor y en el esquema de actualización síncrona, las cuencas de atracción no se intersectan. Los puntos fijos, dado que son independientes en el tiempo, son idénticos en el esquema síncrono y en los asíncronos. Sin embargo, los atractores de ciclo no tienen contraparte en el esquema asíncrono. En su lugar aparece otro tipo de atractores llamados *loose attractor* en donde el sistema transita en una trayectoria irregular dentro del conjunto de posibles estados sucesores [47].

En el análisis de redes Booleanas se estudian los atractores porque representan estados estables en el sistema y están ligados con su comportamiento a largo plazo. Además, diversos estudios han demostrado que algunos atractores corresponden a rasgos físicos y conductuales en la célula, es decir, a **fenotipos celulares** específicos, dándoles así un significado biológico. Ejemplos de estos estudios son la red de regulación formada por los genes que participan en el desarrollo de la *Drosophila melanogaster* [11] y en el control de la morfogénesis de la *Arabidopsis thaliana* [79] y la vía de señalización en la regulación del movimiento de los espermatozoides de erizos de mar [26].

Las redes Booleanas tienen limitaciones en su poder de modelado ya que simplifican la estructura y dinámica de los sistemas biológicos. Por ejemplo, asumen un determinismo en las interacciones entre los componentes y reducen el espectro de posibles valores al considerar solamente unos y ceros. El tamaño de la red también tiene que tomarse en cuenta ya que el número de estados se incrementa de forma exponencial en relación con el número de vértices. Se pueden computar los diagramas de transición de estados y los atractores de grandes redes Booleanas, sin embargo, obtener conocimiento de estos análisis se vuelve difícil [67, 124].

Las redes Booleanas probabilísticas fueron introducidas para expresar incertidumbre en la lógica regulatoria. En éstas, un componente puede estar regulado por más de una función booleana, cada una con una probabilidad asociada y en cada paso de tiempo se elige una función de forma aleatoria para actualizar el valor del componente. Entonces, un estado

inicial puede transitar por varias trayectorias con diferentes probabilidades [108]. Por su parte, las redes lógicas generalizan a las redes Booleanas ya que permiten que las variables tengan más de dos valores. Cada arista en la gráfica está etiquetada con un número que indica un umbral y el signo de la influencia regulatoria [21].

En los modelos continuos la dinámica de los sistemas biológicos se formula con sistemas de ecuaciones diferenciales. Las concentraciones de RNAs, proteínas y otras moléculas se modelan con variables dependientes del tiempo, en una escala continua, y valores en un conjunto de números reales no negativos. Los modelos continuos son teóricamente más precisos, pero la falta de mediciones *in vivo* o *in vitro* de los parámetros cinéticos requeridos dificulta su uso. Dichos parámetros están disponibles sólo para un número reducido de interacciones y en la mayoría de los casos se realizan estimaciones o inferencias para que los modelos reproduzcan el comportamiento cualitativo observado [57, 67].

La necesidad de predicciones cuantitativas y continuas en el tiempo de modelos que integren tanto señalización celular como regulación genética y vías metabólicas, ha impulsado el desarrollo de modelos híbridos, los cuales ganan cada vez más atención en la biología de sistemas. Estos modelos integran diferentes formalismos y datos experimentales de tecnologías diversas para incrementar el poder de predicción y dar una representación más precisa del sistema biológico subyacente [95]. Disciplinas emergentes como la biología sintética, que se enfoca en el diseño e ingeniería de sistemas biológicos [29], requiere de modelos híbridos y modulares para predecir el comportamiento de sistemas compuestos a partir del ensamble de partes individuales y las redes Booleanas juegan también un papel importante en este tipo de modelos. Por ejemplo, se ha propuesto un conjunto de partes biomoleculares para construir máquinas de estado finitas arbitrarias a partir de la demostración de que una máquina de estados finita es computacionalmente equivalente a una red de regulación genética modelada con una red Booleana [86]. Este tipo de nuevas propuestas en cuanto a metodologías, software y formalismos para el desarrollo de modelos híbridos e integradores, serán cada vez más comunes en la literatura [67].

Una revisión detallada de diversos formalismos de modelación se encuentra en: [16, 21, 57, 67, 82].

La modelación de procesos biológicos como la regulación genética, las vías de señalización y las vías metabólicas permite entender mejor cómo las células responden tanto a estímulos del ambiente como a perturbaciones internas y permiten también investigar y contrarrestar artificialmente las alteraciones causadas por diversas enfermedades.

La calidad de un modelo puede ser evaluada tomando en cuenta qué tan similares son sus predicciones a los datos experimentales. Si dos modelos generan predicciones que concuerdan de igual forma con los datos, el modelo más simple es preferible ya que puede ser mejor entendido y será más fácil integrarlo con otros modelos [57].

Las conclusiones que surgen de la simulación de redes Booleanas son muy valiosas para entender el comportamiento del proceso biológico que se modela: los atractores del sistema proveen información de los estados estables alcanzados a largo plazo y éstos tienen significado biológico; la simulación de perturbaciones en los componentes del sistema proponen nuevas hipótesis que después pueden ser probadas experimentalmente [26]. Todo esto sabiendo solamente si las interacciones son de naturaleza activadora o inhibidora, con un modelo dinámico de fácil implementación computacional y sin requerir detalles cinéticos, ya que las redes Booleanas asumen que la estructura del sistema que describen es más importante que la cinética de las interacciones individuales [113].

# Fibrosis hepática, células estelares y PPAR $\gamma$

---

La fibrosis hepática es un proceso de cicatrización resultado de daño crónico en el hígado y la acumulación progresiva, más falta de reestructuración de colágena en la matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés) [17, 32]. La matriz extracelular es una compleja red de proteínas y polisacáridos que, junto con las células, forman el tejido. Las macromoléculas que componen la ECM son secretadas por las mismas células residentes, por lo que se genera una interacción muy cercana entre la superficie de las células productoras y la matriz. Ésta no solo provee de soporte físico, sino que regula el comportamiento de las células influenciando su supervivencia, desarrollo, migración, proliferación, forma y funciones [12].

La cirrosis es la fase final de la fibrosis hepática y se caracteriza por una distorsión en el funcionamiento y la arquitectura del tejido. En la mayoría de los pacientes, la progresión a cirrosis ocurre en un intervalo de entre 15 y 20 años [17].

La fibrosis puede acompañar cualquier enfermedad crónica del hígado que se caracterice por una patología hepatobiliar o inflamación. Comúnmente se desarrolla como consecuencia de hepatitis crónica por virus C o virus B, consumo excesivo de alcohol y **esteatohepatitis no alcohólica**, pero también puede desarrollarse por enfermedades parasitarias, enfermedades metabólicas o autoinmunes y condiciones de inflamación crónica, entre otras patologías [32].

## Tipos celulares que participan en la fibrosis

Sin importar la **etiología** de la fibrosis, el proceso se caracteriza por fuerte grado de interacciones persistentes entre los diferentes tipos celulares que conforman al hígado. Para interactuar, las células sintetizan y secretan diversas proteínas mediadoras tales como factores de crecimiento, citocinas, etc [85].

El hígado normal se compone de hepatocitos, que son células epiteliales; células endoteliales, macrófagos que fagocitan glóbulos rojos envejecidos llamadas células Kupffer y células estelares hepáticas (HSCs por sus siglas en inglés).

El sinusoides es la unidad microvascular hepática. Tiene una capa de células endoteliales que se distingue por ser porosa y está separada de los hepatocitos por el espacio de Disse, donde residen las HSCs. Este espacio contiene matriz extracelular basal de baja densidad que es esencial para mantener las funciones de los diferentes tipos celulares pero es suficientemente porosa para permitir el intercambio metabólico entre los hepatocitos y el flujo sanguíneo [31, 51].

Con la fibrosis se distorsiona el comportamiento de prácticamente todos los tipos celulares que componen al hígado. Un cambio primordial ocurre en las células estelares hepáticas que se transforman en un tipo diferente de células, es decir, transdiferencian a miofibroblastos; se convierten en la fuente principal de matriz extracelular y sustancias profibrogénicas en un proceso conocido como **activación**, con el cual también adquieren un **fenotipo** proliferativo y contráctil [31].

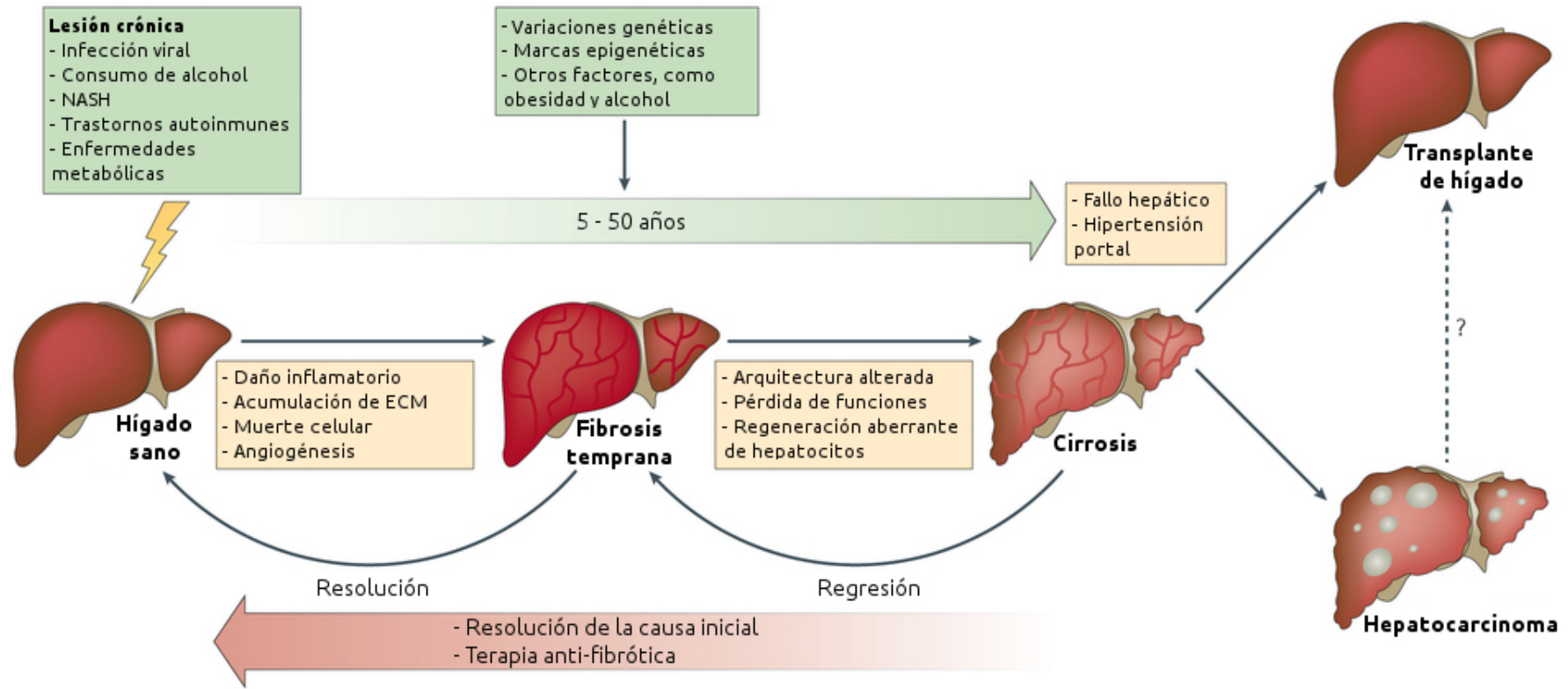


Figura 2: Progresión de daño en el hígado. La fibrosis hepática es un proceso de cicatrización en respuesta a daño crónico en el hígado, ocasionado comúnmente por infección viral, consumo de alcohol y esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), entre otros padecimientos. Sin importar la causa inicial, el padecimiento constante ocasiona daño debido a la respuesta inflamatoria, acumulación y falta de reestructuración en la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), muerte celular y angiogénesis, resultando en fibrosis progresiva. El tejido fibrótico se acumula lentamente, pero una vez que se establece la cirrosis, se desarrollan otras complicaciones y el potencial para revertir el proceso decremanta. Las variaciones genéticas, las marcas epigenéticas y factores como la obesidad y el consumo de alcohol, modulan el riesgo de progresión de la fibrosis. Si la causa inicial se elimina, puede lograrse la resolución, es decir, se revierte la arquitectura del hígado a una similar a la de un hígado sano. En la cirrosis, aunque la resolución completa no es posible, puede haber una regresión que mejora la condición clínica del paciente. Actualmente, el transplante es el único tratamiento disponible cuando ocurre fallo hepático y para algunos casos de cáncer en el hígado. Imagen modificada de: A Pellicoro, P Ramachandran, J Iredale, J Fallowfield. **Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ.** *Nat Rev Immuno*, 14:181–194, 2014.

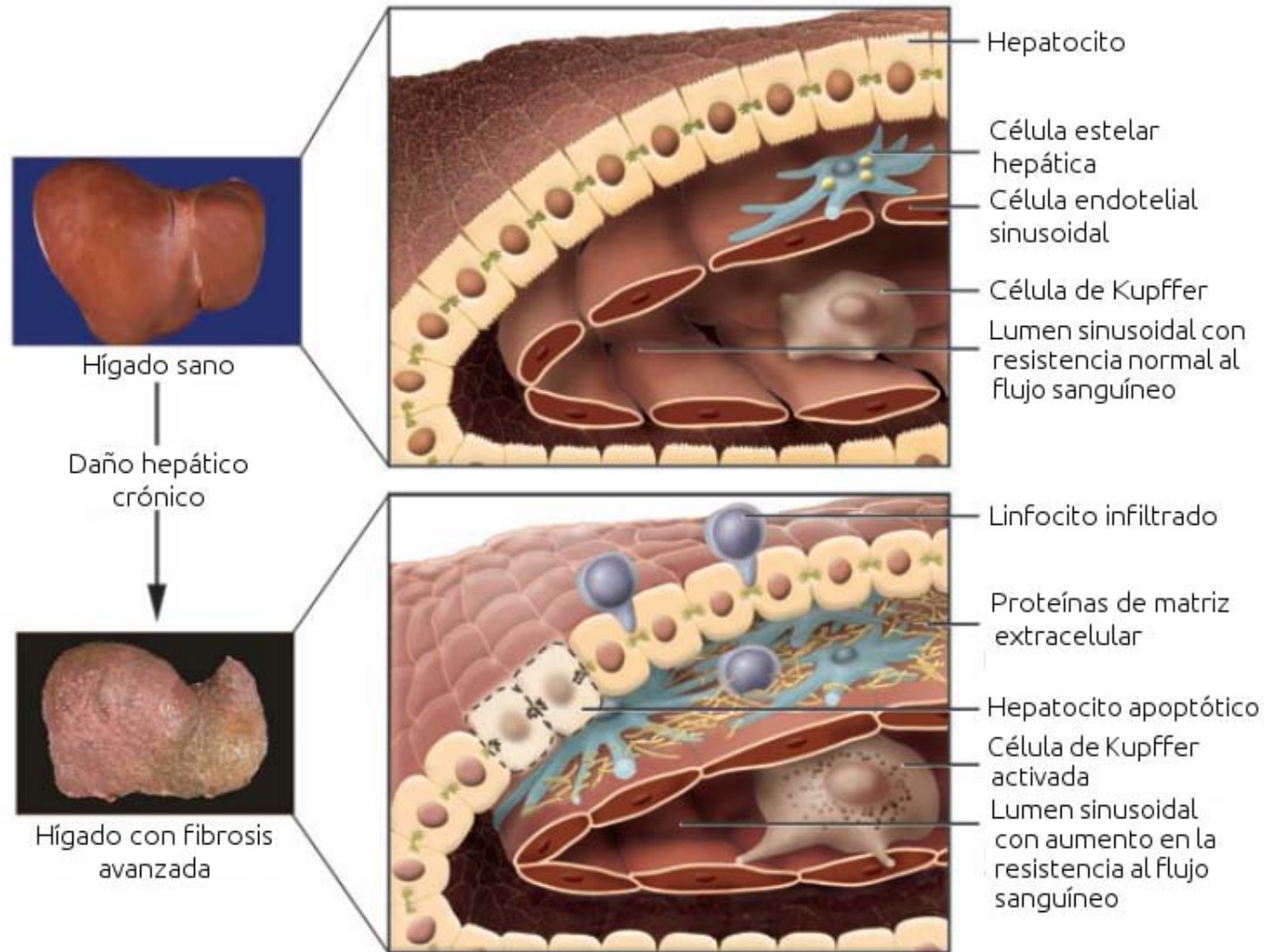


Figura 3: Tipos celulares en el hígado y sus cambios durante la fibrosis. El daño hepático crónico ocasiona la activación de células estelares hepáticas, las cuales proliferan y secretan grandes cantidades de moléculas que componen la matriz extracelular. También las células de Kupffer sufren un proceso de activación, mientras que en algunos hepatocitos se observa apoptosis o muerte celular. Los linfocitos, células del sistema inmune, se infiltran en el tejido como respuesta a la liberación de citocinas y demás cambios en los tipos celulares del hígado. Además, se incrementa la resistencia al flujo sanguíneo debido, entre otras cosas, a la concentración de células estelares hepáticas. Imagen modificada de: R Bataller, D Brenner. **Liver fibrosis.** *J. Clin. Invest.* 115:209–218, 2005.



La muerte de hepatocitos ocasionada por padecimientos hepáticos es también uno de los fenómenos que conducen a la inflamación crónica del hígado y la fibrosis. Los restos de estas células promueven secreción de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas en las células Kupffer y fomentan la activación de las HSCs. Las células Kupffer también sufren un proceso de activación durante la fibrosis. Las sustancias que secretan favorecen la supervivencia de las HSCs activadas, con lo que el número de estas células se mantiene elevado. La contribución de las células endoteliales y las plaquetas es también relevante ya que son una fuente adicional de factores de crecimiento, citocinas y otras sustancias [85, 103].

## Composición de la Matriz Extracelular Hepática

En el hígado sano hay un balance cuidadosamente regulado entre la producción de matriz extracelular y su degradación; este balance se altera con la fibrosis, afectando tanto la cantidad como la composición de la matriz extracelular.

La matriz del espacio de Disse en un hígado normal se compone principalmente de colágena tipo IV y tipo VI. Con daño hepático, esta matriz se reemplaza por colágena fibrilar; es decir, colágena tipo I y III. Además se acumulan proteínas como fibronectina, elastina, proteoglicano, entre otras. Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores, los inhibidores tisulares de metaloproteinasa (TIMPs, por sus siglas en inglés), son agentes esenciales en la regulación de la producción de la ECM. Los diferentes tipos de MMPs pueden degradar diversos componentes de la matriz extracelular, además de otras proteínas [32].

Los cambios estructurales que sufre la matriz extracelular durante la fibrosis, dirigidos principalmente por las células estelares hepáticas, crean un impedimento físico y funcional para el flujo bidireccional de señales entre los sinusoides y los hepatocitos, lo que contribuye a su disfunción. Además, la acumulación de matriz extracelular produce un *feedback* positivo, activando receptores en la membrana de las células del hígado que amplifican la señal fibrogénica para producir más ECM [25]. En la comunicación entre la ECM y las células contiguas son importantes las integrinas, proteínas en la membrana que interactúan directamente con la matriz extracelular, y las citocinas, proteínas responsables de la comunicación intercelular. Entre las citocinas que juegan un papel primordial en el proceso de fibrosis, se encuentran: TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor beta*), PDGF (*Platelet-derived growth factor*), CTGF (*Connective tissue growth factor*) y TNF (*Tumor necrosis factor alpha*). TGF- $\beta$  es la citocina con mayores efectos fibrogénicos para las células estelares hepáticas [40], mientras que PDGF es el mitógeno (promotor de mitosis), más potente. [88].

## Reversibilidad de la fibrosis

Estudios experimentales y clínicos han aportado evidencia considerable que sugiere que la fibrosis, e inclusive la cirrosis deben ser considerados como proceso potencialmente reversibles. Una condición necesaria es la eliminación o el tratamiento eficiente del agente que causa el padecimiento hepático. Se ha observado reversión o regresión en pacientes con fibrosis causada por infección viral crónica, esteatohepatitis no alcohólica, consumo de alcohol y hepatitis autoinmune. Sin embargo, no se ha reportado evidencia concluyente de reversión completa en pacientes con cirrosis avanzada. No se sabe si existe un punto crítico

después del cual la cirrosis pueda ser irreversible ni tampoco se conocen los mecanismos exactos que disparen la regresión [51, 85].

Con la reversión de la fibrosis, la población de células estelares hepáticas en el hígado sufre **apoptosis** (muerte celular), o bien puede revertir su estado hacia un fenotipo quiescente. La fracción de las HSCs que siguen uno u otro destino no se conoce con exactitud. El ambiente en el tejido hepático cambia con la reversión y las células dejan de secretar señales pro-fibrogénicas y de supervivencia, lo que favorece también la reversión de las HSCs [61, 118].

La inducción de las células estelares hepáticas hacia un estado quiescente puede promoverse mediante la activación de mecanismos que modifiquen el **perfil de expresión genética** de las células. Un mecanismo esencial es promover la producción de PPAR $\gamma$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*). PPAR $\gamma$  es un receptor nuclear dependiente de ligando que actúa como factor de transcripción y se expresa predominantemente en tejido adiposo, donde juega un papel importante para el metabolismo de energía y grasas. Las HSCs en estado quiescente expresan PPAR $\gamma$ , pero durante la activación su presencia se reduce contundentemente y se ha demostrado que la restauración de su expresión y su actividad contrarresta muchos de los factores que fomentan la activación de las HSCs [48, 81].

## Activación de las Células Estelares Hepáticas

La activación de las HSCs ocasiona cambios distintivos en su comportamiento incluyendo proliferación, quimiotaxis<sup>1</sup>, fibrogénesis, contractilidad, pérdida de retinoides y liberación de citocinas y atractores de glóbulos blancos, es decir, regulación de la respuesta inmune [25]. En estado de quiescencia, la característica principal de las HSCs es su capacidad para almacenar vitamina A en forma de retinoides. Entre el 50 y el 80 % de la vitamina A en el cuerpo se almacena en las células estelares hepáticas quienes además de regular su almacenamiento, también regulan su transporte [33].

El proceso de activación es un proceso continuo en el que los primeros cambios en el fenotipo celular se distinguen de aquéllos que ocurren cuando la lesión progresa; las características de crecimiento, la respuesta a señales y el riesgo de apoptosis es distinto mientras la célula atraviesa por las diferentes etapas de la activación [33].

Los cambios en el perfil de expresión genética de las células estelares hepáticas debidos al proceso activación son múltiples y se ha observado que diferentes modelos experimentales de fibrosis producen patrones de expresión muy similares, sugiriendo que la activación es un proceso prácticamente conservado e independiente de la etiología [103]. En particular, la expresión de la proteína  $\alpha$ -SMA (*Alpha smooth muscle actin*) funge como el marcador más confiable de la activación de las HSCs, ya que no se encuentra en otras células del hígado ni sano, ni dañado.  $\alpha$ -SMA es una proteína que forma parte de la familia de las actinas, componentes principales del citoesqueleto<sup>2</sup> en eucariotas<sup>3</sup> [33].

---

<sup>1</sup>Fenómeno en el que las células dirigen sus movimientos de acuerdo con la concentración de ciertas sustancias químicas en su medio ambiente.

<sup>2</sup>Estructura interna que provee de soporte a las células.

<sup>3</sup>Células con núcleo delimitado que contiene su material genético.

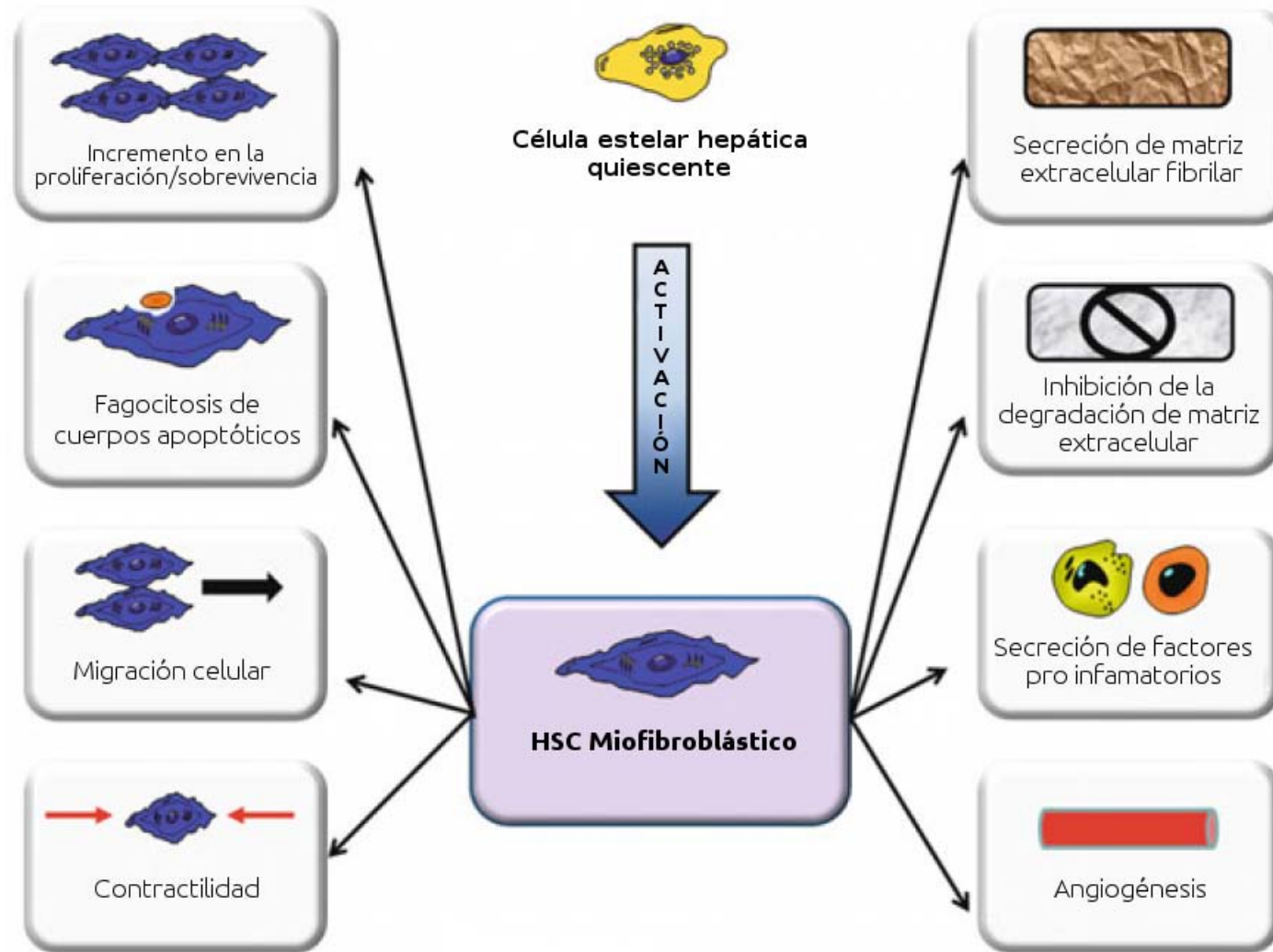


Figura 4: Activación de las células estelares hepáticas. Uno de los cambios primordiales en la progresión de la fibrosis es la activación de las células estelares hepáticas, que ocasiona una transdiferenciación o transformación a un tipo diferente de células, de HSCs, a miofibroblastos. En estado de quiescencia, la característica principal de las HSCs es su capacidad para almacenar vitamina A en forma de retinoides. Con la activación se convierten en la fuente principal de matriz extracelular y sustancias profibrogénicas, inhiben la degradación de la matriz extracelular, adquieren un fenotipo contráctil y proliferativo y se incrementa su capacidad de sobrevivencia. Además, liberan citocinas y atractores de glóbulos blancos activando la respuesta inmune y promueven la formación de vasos sanguíneos o angiogénesis. Imagen modificada de: F Marra, M Parola. **Cells in the Liver-Functions in Health and Disease**. *Clinical Gastroenterology: Chronic Liver Failure*. Humana Press. 3–32, 2011.

En el proceso de activación de las células estelares hepáticas se han identificado fases temporales donde, si bien no existen límites específicos en una escala de tiempo, pueden distinguirse eventos biológicos característicos [31]. La *iniciación* se refiere a los cambios tempranos en la expresión genética de la célula y en su fenotipo. Dichos cambios permiten que la célula responda a diversos estímulos y señales. La estimulación **paracrina**<sup>4</sup> es muy importante en esta fase ya que los tipos celulares vecinos son los responsables de la inducción de los primeros cambios en la activación de las células estelares. La *perpetuación* resulta de los efectos de estos estímulos al mantener el fenotipo de activación y el avance de la fibrosis. La *perpetuación* incluye regulación paracrina y **autocrina**<sup>5</sup>. Finalmente, la *resolución* se presenta cuando el tejido logra restaurarse, es decir, cuando se revierte la fibrosis [33].

## Iniciación

Las señales, mediadas por citocinas, que inducen la activación de las células estelares hepáticas provienen principalmente de los hepatocitos dañados y del ambiente perturbado del tejido hepático. Las células endoteliales producen FN-1 (*Fibronectin*), TGF- $\beta$  y PDGF, en respuesta al daño. Las plaquetas son fuente de TGF- $\beta$ , EGF (*Epidermal growth factor*) y PDGF. Por su parte, las células Kupffer liberan TGF- $\beta$  y ROS (reactive oxygen species) o especies reactivas de oxígeno y peróxidos lípidos que estimulan el estrés oxidativo<sup>6</sup>. Los hepatocitos son también una fuente potente de peróxidos lípidos. Además, la apoptosis en hepatocitos es una característica común del daño hepático y los restos de estas células promueven la activación en las HSCs [25]. De forma contraria, las células NK (*Natural killer*), previenen la fibrosis induciendo apoptosis en las células estelares durante la iniciación, mediante la citocina Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) [103].

## Perpetuación

La perpetuación de la activación de las células estelares hepáticas incluye, al menos, siete cambios en el comportamiento celular: proliferación, quimiotaxis, fibrogénesis, contractilidad, degradación de la matriz, pérdida de retinoides y promoción de la respuesta inmune. El efecto neto en estos cambios es la creciente acumulación de matriz extracelular [33]. Las citocinas y los mecanismos celulares que éstas desencadenan, comúnmente participan en más de una de las categorías mencionadas, además el entrecruzamiento entre dichos mecanismos es algo común en la señalización celular. A continuación, se describen las principales interacciones en esta etapa.

### Proliferación - PDGF

PDGF, además de ser el más potente mitógeno de las células estelares hepáticas en ratas, ratones y humanos, regula otros cambios durante la activación como la quimiotaxis, fibrogénesis y la pérdida de retinoides. Los receptores para esta citocina son de tres tipos: -AA, -AB y -BB y uno de los primeros eventos en la activación de las HSCs es el incremento en la presencia de receptores tipo B, como resultado de la señalización de TGF- $\beta$  [19].

---

<sup>4</sup>Comunicación celular donde una célula emisora secreta sustancias que afectan a una célula vecina.

<sup>5</sup>Comunicación celular donde la secreción química afecta a la misma célula que secretó la sustancia.

<sup>6</sup>Aumento desequilibrado en los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos orgánicos e inorgánicos, capaz de causar daños celulares severos, como apoptosis.

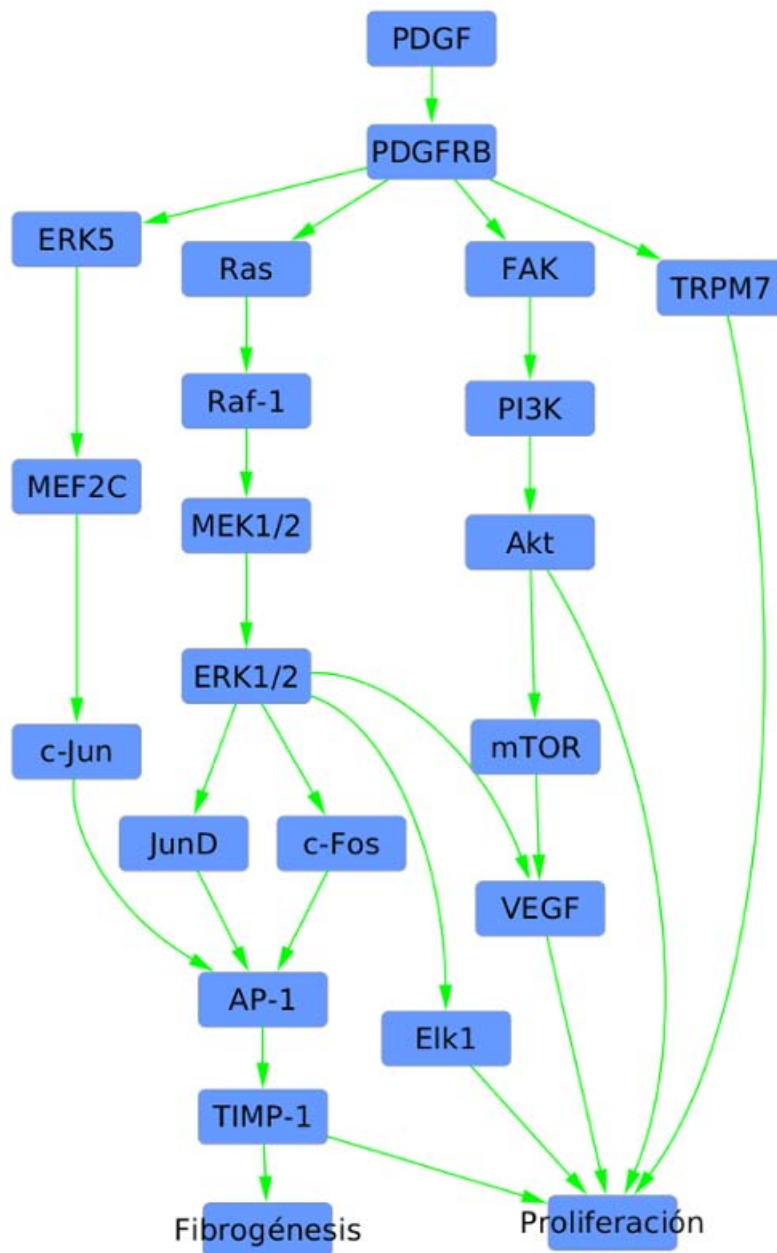


Figura 5: Gráfica de las interacciones en la vía de señalización de PDGF. PDGF es el principal promotor de proliferación en las células estelares hepáticas. La unión de PDGF con su receptor, PDGFRB, dispara la cascada de señalización de las MAP quinasas (Raf-1, MEK1/2 y ERK1/2) y activa a ERK5 lo que resulta en la activación del complejo AP-1, un factor de transcripción que regula de forma positiva a TIMP-1, proteína que inhibe la reestructuración de ECM y genera una señal antiapoptótica en las HSCs. PDGF también activa a PI3K y Akt, que estimula la proliferación, previene apoptosis y activa a mTOR, que junto con ERK1/2 incrementa la producción de VEGF, promotor de angiogénesis. PDGF también aumenta la transcripción de TRPM7 lo cual se ha relacionado con mayor proliferación celular.

La unión de PDGF con su receptor produce la activación de Ras y dispara la cascada de señalización de las MAP cinasas o quinasas, donde tres tipos de proteínas diferentes se fosforilan de forma consecutiva para transmitir una señal desde la membrana celular al núcleo. Ras activa a Raf-1, una MAP quinasa quinasa quinasa, ésta activa a MEK1/2 y finalmente se activa ERK1/2 [88]. ERK1/2 activa al factor de transcripción Elk1, importante mediador de la proliferación en las HSCs, a JunD (*Jun D proto-oncogene*) y promueve la expresión de c-Fos [110]. Heterodímeros<sup>7</sup> de JunD o c-Jun con c-Fos forman parte del complejo AP-1 (*Activator Protein 1*). AP-1 es un factor de transcripción que no interviene en la regulación de la expresión de HSCs quiescentes, pero se hace presente en el proceso de activación principalmente por la alta concentración de JunD. AP-1 regula de forma positiva la transcripción de TIMP-1, inhibidor de diversas metaloproteinasas, que además genera una señal antiapoptótica en las células estelares hepáticas [77, 111].

El receptor de PDGF también activa a FAK (*Focal adhesion kinase*), lo cual atrae a PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*) al complejo y ocasiona su fosforilación. PI3K activa a Akt, una proteína crucial para la estimulación de proliferación celular y prevención de apoptosis [121]. Akt activa también a mTOR y junto con la activación de ERK1/2, promueve el incremento en la producción de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), una citocina altamente pro-angiogénica, es decir, que promueve la formación de vasos sanguíneos y también tiene efectos en la proliferación celular [135]. Aunque la angiogénesis es considerada benéfica para el desarrollo y regeneración del tejido, también agrava enfermedades relacionadas inflamación y fibrosis, como es el daño en el hígado [135].

Otra de las quinasas activadas por PDGF es ERK5, que también exhibe actividad que favorece la proliferación celular. ERK5 activa al factor de transcripción MEF2C, que estimula la producción de c-Jun [94].

PDGF también aumenta la transcripción de TRPM7, una proteína que se encuentra en la membrana celular y que funciona como canal de iones, regulando los niveles de calcio y magnesio. En el proceso de activación de las HSCs se incrementa la presencia de TRPM7, lo cual se ha relacionado con mayor proliferación [28].

### **Fibrogénesis - TGF- $\beta$ , CTGF, Leptin**

TGF- $\beta$  es el factor de crecimiento más eficaz para la producción de colágena I y otros componentes de la matriz extracelular en las células estelares. Además, regula la expresión de las metaloproteinasas (MMPs), encargadas de degradar matriz y sus inhibidores, los TIMPs [122]. La expresión de TGF- $\beta$  es una condición necesaria en la progresión de la fibrosis en el hígado y la interrupción de su señalización es capaz de reducir la fibrogénesis [24]. En el hígado normal, las células estelares expresan cantidades muy bajas de TGF- $\beta$  en comparación con las células endoteliales y las Kupffer. Con la activación se convierten en el tipo celular que contribuye mayoritariamente a la expresión de TGF- $\beta$ , primero mediante inducción paracrina y después con inducción autocrina [54].

La cascada de señalización de TGF- $\beta$  comienza cuando la citocina se une a su receptor en la membrana celular. Una vez unido el ligando, las señales en el interior de la célula pueden tomar diferentes vías. La mejor estudiada inicia cuando el receptor fosforila a las proteínas Smad2 y Smad3, las cuales se unen a Smad4 para formar un complejo capaz de desplazarse al interior del núcleo celular y promover la transcripción de diversos genes. Usualmente en esta acción participan otros factores de transcripción y coactivadores que facilitan la unión del complejo al ADN, como SP1 y p300 [68].

---

<sup>7</sup>Complejo formado por moléculas diferentes

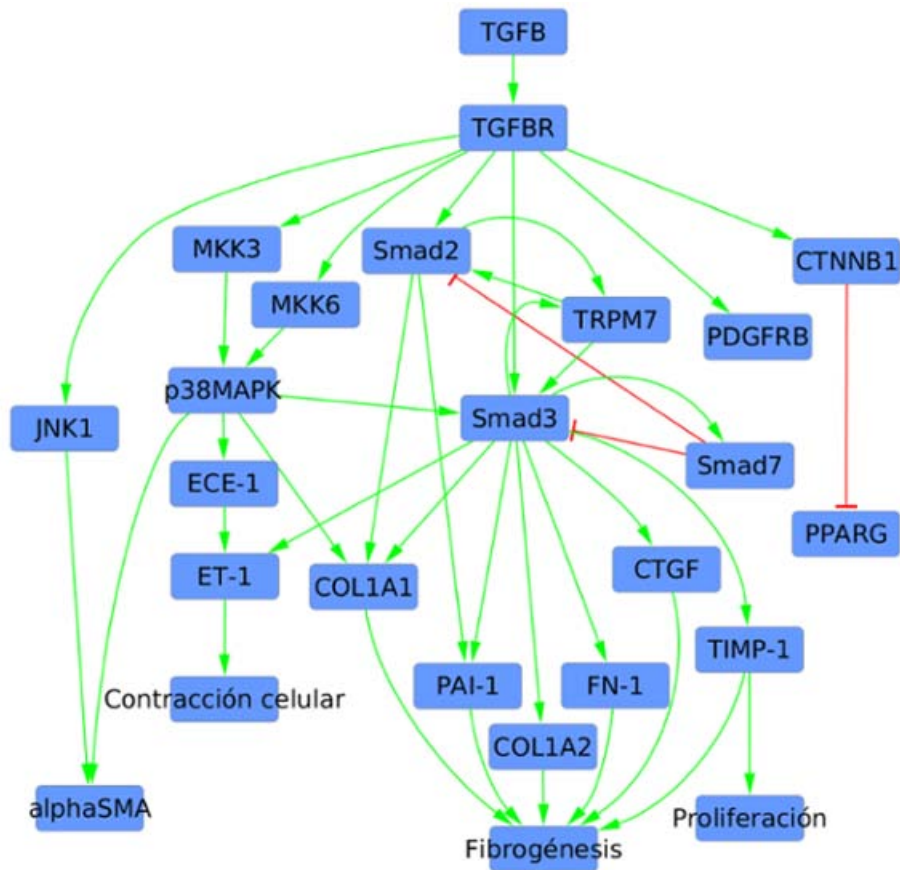


Figura 6: Gráfica de las interacciones en la vía de señalización de TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  es el principal promotor de la producción de COL1A1 y otros componentes de la ECM, su expresión es una condición necesaria en la progresión de la fibrosis. Cuando TGF- $\beta$  se une a su receptor de la membrana activa a Smad2 y Smad3, quienes incrementan la expresión de diversos genes como COL1A1, COL1A2, CTGF, TIMP-1, FN-1, TRPM7 y PAI-1, todos con efectos fibrogénicos. Además, Smad3 promueve la expresión de Smad7, un regulador negativo que inactiva a Smad2 y Smad3, terminando con la señal de TGF- $\beta$ . También incrementa la expresión de ET-1, principal actor en el fenotipo contráctil de las HSCs, mediante una cascada de quinasas y la expresión de  $\alpha$ -SMA, marcador de la activación de las células estelares hepáticas.

Smad2 y Smad3 regulan la expresión de diferentes genes y se ha demostrado que la actividad de Smad3 agrava en mayor grado la activación de las HSCs. Smad3 promueve la transcripción de COL1A2, CTGF, FN-1 (*Fibronectin 1*), TIMP-1 [54, 73, 137] y ET-1 (*Endothelin 1*), principal actor en el fenotipo contráctil de las HSCs [70]. Promueve también la expresión Smad7, un regulador negativo de la señal de TGF- $\beta$ . En una lesión aguda, Smad7 es capaz de inhibir la fosforilación de Smad2 y Smad3 y terminar con la señal de TGF- $\beta$ ; en cambio, cuando existe daño crónico, Smad3 es incapaz de incrementar la transcripción de Smad7 [23].

En conjunto, Smad2 y Smad3 promueven la expresión de COL1A1 y de PAI-1 (*Plasminogen activator inhibitor type 1*), proteína involucrada en la inhibición de enzimas que degradan ECM. Promueven también la expresión de TRPM7, produciendo un *feedback-loop* ya que el receptor contribuye a la fosforilación de Smad2 y Smad3 [27, 119, 122].

TGF- $\beta$  puede también activar a p38 MAPK (*P38 mitogen-activated protein kinase*), previa activación de MKK3 (*Mitogen-activated protein kinase kinase 3*) y MKK6. p38 MAPK fosforila a Smad3 sin participación de Smad2 y tanto p38 MAPK como Smad3 promueven la producción de COL1A1 de forma independiente [34, 119]. Además, como resultado de la señalización de TGF- $\beta$ , p38 MAPK induce la expresión de ECE-1 (*Endothelin-converting enzyme-1*), una enzima esencial para la activación de ET-1 [60, 106].

En cuanto a la expresión de  $\alpha$ -SMA, se ha encontrado que TGF- $\beta$  la promueve mediante JNK1 y mediante p38 MAPK [52, 119].

La señal de TGF- $\beta$  induce mecanismos que inhiben la actividad de PPAR $\gamma$ . TGF- $\beta$  produce CTNNB1 (*Catenin  $\beta$* ), que disminuye la expresión de PPAR $\gamma$  [89]. De hecho, el bloqueo de la señal de Wnt, una proteína que estabiliza la actividad de CTNNB1 restaura la expresión de PPAR $\gamma$  [80].

CTGF (*Connective tissue growth factor*) es otro actor importante en la inducción de fibrosis que también promueve la proliferación y sobrevivencia en las células estelares activadas [87]. CTGF responde a la señal de TGF- $\beta$ ; de hecho, la expresión de CTGF requiere que la señalización de TGF- $\beta$  se encuentre intacta [73].

Las células estelares hepáticas carecen de un completo repertorio funcional de receptores para CTGF, por lo que la sobreexpresión de este factor de crecimiento no es suficiente para promover la activación de las HSCs. Su receptor principal es la integrina  $\alpha_5 \beta_3$  [37, 53].

CTGF promueve la producción de c-Fos y la activación de Elk1 [36]. También promueve la producción de colágena tipo 1 [87] y  $\alpha$ -SMA [90].

Mediante el receptor integrina  $\alpha_5 \beta_3$ , CTGF activa a Nf- $\kappa$ B para promover la supervivencia de las HSCs y prevenir apoptosis [38]. La actividad de Nf- $\kappa$ B está regulada por un *feedback* negativo ya que el factor de transcripción promueve también la expresión de su inhibidor, I $\kappa$ B- $\alpha$ , cuya actividad citoplásmica se ve bastante reducida en las HSCs activadas [75, 77].

*Leptin* es una hormona con un rol importante para el balance de energía y el control del apetito. Sus receptores se encuentran principalmente en el tejido del sistema nervioso central, pero también se localizan en el hígado. Las células estelares expresan *leptin* solamente cuando ocurre el proceso de activación. *Leptin* se une a su receptor, induciendo la fosforilación de las proteínas JAK2 y STAT3 para incrementar la expresión de COL1A2 y  $\alpha$ -SMA [100], promover la expresión de TIMP-1 e inhibir la producción de MMP-1, agravando la fibrosis [45]. Mediante JAK2, *leptin* activa a PI3K y a AKT, lo cual promueve la proliferación y la supervivencia de las células estelares hepáticas [101]. Además, *leptin* disminuye la expresión de PPAR $\gamma$  mediante la activación de AKT [142, 143].



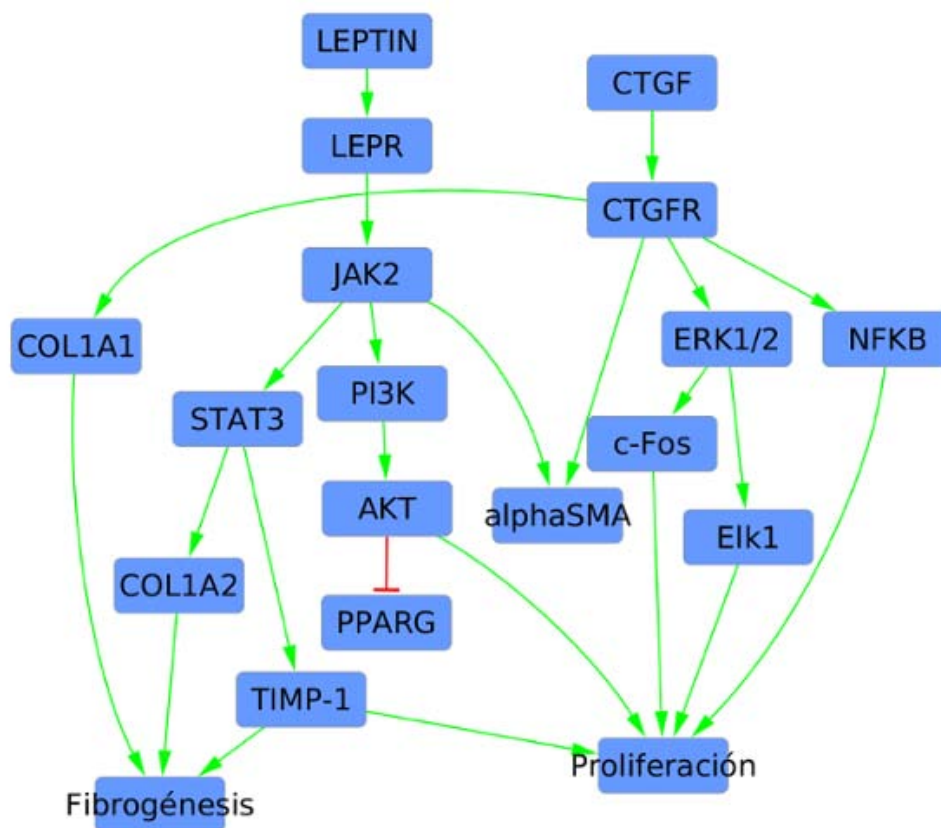


Figura 7: Gráfica de las interacciones en la vía de señalización de CTGF y *Leptin*. CTGF responde a la señal de TGF- $\beta$  y es también promotor de la producción de COL1A1 y de proteínas que incrementan la proliferación de las células estelares hepáticas como Elk-1 y Nf- $\kappa$ B, además regula de forma positiva a  $\alpha$ -SMA. Leptin es una hormona que participa también en la regulación de la expresión de moléculas fibrogénicas, en el incremento en la proliferación de las células estelares hepáticas y la producción de  $\alpha$ -SMA. Además, es importante porque inhibe la actividad de PPAR $\gamma$ , un factor de transcripción clave para mantener el fenotipo quiescente en las HSCs.

### Contractilidad - ET1

La activación en las células estelares hepáticas está acompañada por un incremento en la expresión de proteínas características de células contráctiles [25]. Las bandas de colágena típicas de las últimas etapas de la cirrosis contienen un gran número de células estelares activadas que, al adquirir un fenotipo contráctil, son capaces de modular el diámetro de los sinusoides debido a su forma y localización. La constricción de los sinusoides impide el flujo de sangre y ocasiona hipertensión portal [92, 91].

ET-1 (*Endothelin 1*) es una proteína capaz de inducir contractilidad en las células estelares hepáticas mediante el incremento los niveles de calcio intracelular, además promueve proliferación y fibrosis [41]. ET-1 está distribuida ampliamente en el hígado, secretada por las células endoteliales. Después del daño en el órgano, la señal paracrina contribuye a la activación de las HSCs, quienes se convierten en principales productoras de ET-1 e incrementan el número de receptores para esta proteína [93, 59, 112].

En la señal autocrina que resulta en la producción de ET-1 por las HSCs participan,

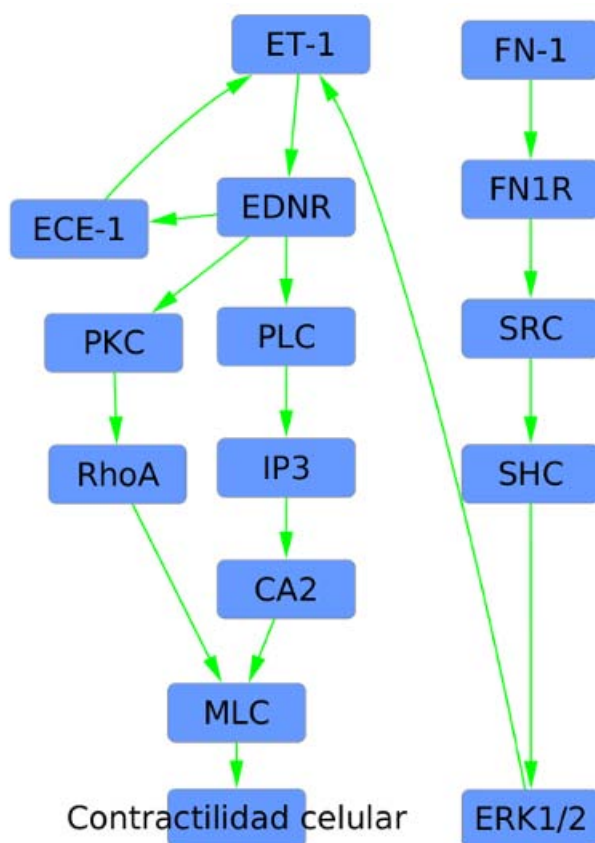


Figura 8: Gráfica de las interacciones en la vía de señalización de ET-1. ET-1 es el principal promotor del fenotipo contráctil en las HSCs. FN-1 producido gracias a TGF- $\beta$ , se une a su receptor y activa una cascada de señalización que, mediante Erk1/2, incrementa la expresión de ET-1. Son dos los mecanismos mediante los cuales ET-1 induce contractilidad en las células estelares, uno dependiente y uno independiente del incremento de calcio. En el dependiente, la formación de IP3 y el incremento de calcio llevan a la activación de MLC, mientras que en el independiente, los encargados de dicha activación son PKC y RhoA.

al menos, FN-1 (*Fibronectin 1*), TGF- $\beta$  y la propia ET-1. La presencia de FN-1 en la matriz extracelular activa a las integrinas  $\alpha_5\beta_1$  y  $\alpha_V\beta_3$ , éstas comienzan una cascada de señalización donde se activa Src, el complejo Shc/Grb2/Sos y finalmente Erk1/2, quien promueve la expresión de ET-1 [134].

TGF- $\beta$  promueve la producción de ET-1 en las células estelares hepáticas solo después del daño [106] (estas interacciones se muestran en la figura 6). El incremento de ET-1 por TGF- $\beta$  ocurre por diversos mecanismos. Además de que Smad3 promueve su producción, p38 MAPK modula el aumento en la transcripción de ECE-1 (*Endothelin-converting enzyme 1*), una proteína necesaria para la activación de ET-1 [60]. La unión de ET-1 con su receptor (EDNR) también incrementa la producción de ECE-1 [105].

El mecanismo mediante el cual ET-1 induce contractilidad depende del incremento de calcio en las HSCs. ET-1 se une a su receptor, lo que activa a PLC (*Phospholipase C*) y promueve la formación de IP3 (*Inositol trisphosphate*). Esto induce a receptores específicos del retículo endoplásmico que liberan  $Ca^{2+}$  hacia el citosol, resultando en contracción celular gracias a la activación de MLC (*Myosin light chain*) [59].

ET-1 es capaz de inducir contractilidad por una vía independiente de calcio donde los receptores de ET-1 activan a PKC (*Protein kinase C*) y RhoA, quien activa a MLC (*Myosin light chain*) [66].

### **Degradación de la matriz extracelular - MMPs**

La degradación de matriz extracelular es un evento clave en la fibrosis hepática. Diversas proteasas llevan a cabo la disrupción de la matriz basal para acelerar su reemplazo por matriz fibrosa [15]. Las células estelares en el hígado sano son la principal fuente de las proteasas MMP-2, MMP-9 y MMP-13 (proteasa capaz de degradar colágena), mientras que los demás tipos celulares hepáticos muestran diversos patrones de expresión de proteasas, por ejemplo, las células Kupffer son importantes productoras de MMP-9 [64].

La expresión de MMP-9 en las HSCs se incrementa con la presencia de colágena tipo I en el medio, en un proceso que requiere la participación de ERK1/2 [117] y de MMP-13 [43]; además, se ha identificado como promotor de esta proteasa a la interleucina 1 (IL-1) [44]. Las células estelares secretan MMP-13 en forma de proenzima pero son incapaces de activarla. Su regulación es más compleja ya que se han observado patrones irregulares de expresión, en donde las células que expresan colágena I no expresan MMP-13 y viceversa [102].

La actividad de las metaloproteinasas se inhibe debido a la acción de TIMPs (*Tissue inhibitor of metalloproteinases*). En las primeras etapas de activación de las células estelares hepáticas, se secretan las MMPs requeridas para degradar la matriz basal y no se detectan sus inhibidores. Con la prolongada activación, las proteasas dejan de producirse mientras que la expresión de TIMPs se incrementa, disminuyéndose la velocidad de degradación de la matriz extracelular acumulada durante el daño hepático [42]. Las células estelares producen TIMP-1 y TIMP-2, por efecto de la citocina TGF- $\beta$  [69]. TIMP-1 tiene también un efecto anti-apoptótico en las HSCs por lo que su expresión permite el incremento de la población de células estelares hepáticas [83].

### **Respuesta inmune - TNF**

TNF (*Tumor necrosis factor*) es una citocina que interviene en la respuesta inflamatoria y es producida y secretada por células Kupffer y plaquetas en el hígado cuando existe daño [33]. Inhibe la apoptosis de las células estelares hepáticas mediante el incremento en la producción y activación de NF- $\kappa$ B, resultando en aumento en la expresión de la proteína anti-apoptótica bcl-xL [98, 99]. Aún así, los efectos de TNF agravan la fibrosis hepática principalmente por su mecanismo de inhibición de PPAR $\gamma$  mediante la activación de ERK1/2 [115]. Además, también mediante la activación de NF- $\kappa$ B, promueve la expresión de ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*) y VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule*), moléculas que modulan la adhesión de células ejecutoras de la respuesta inmune como los leucocitos [50, 63].

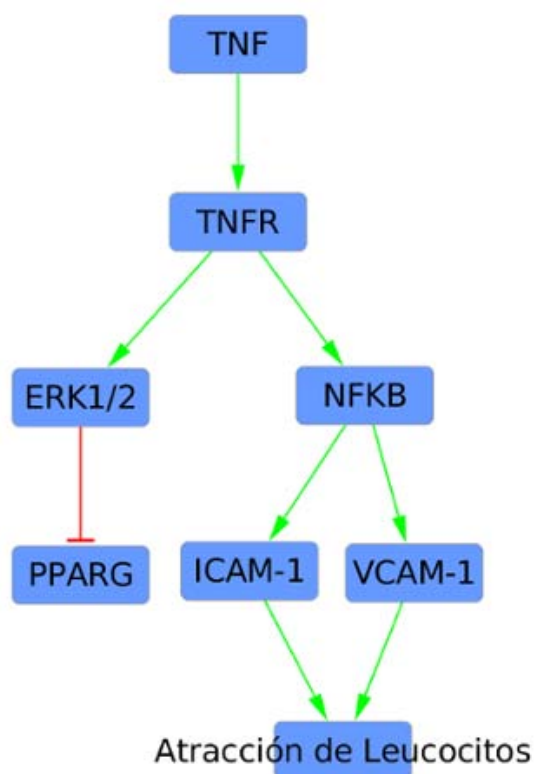


Figura 9: Gráfica de las interacciones en la vía de señalización de TNF. TNF es una citocina secretada por las células Kupffer, que en las células estelares hepáticas activa a NF- $\kappa$ B para promover la expresión de las proteínas ICAM-1 y VCAM-1, que incrementan la adhesión de células del sistema inmunitario como los leucocitos. Además, agrava la progresión de la fibrosis hepática principalmente por su capacidad de inhibir a PPAR $\gamma$ .

## Papel de PPAR $\gamma$ y otras moléculas anti-fibrogénicas

PPAR $\gamma$  es un receptor nuclear presente principalmente en tejido adiposo, pero también puede encontrarse en tejido hepático. En el primero regula la diferenciación de los adipocitos y la homeostasis de glucosa. Además, juega un rol primordial en la diabetes mellitus tipo 2 ya que es regulador de la sensibilidad a insulina y es el blanco de fármacos para el tratamiento de dicha enfermedad [48].

En ausencia de ligandos, PPAR $\gamma$  interactúa con proteínas co-represoras e inhibe la expresión genética. Cuando un ligando se une a PPAR $\gamma$ , éste se disocia de los co-represoras y recluta proteínas co-activadoras, además de formar un complejo con el receptor X retinóide (RXR). El complejo se une a secuencias específicas de ADN llamadas PPRE (*Peroxisome proliferator responsive element*) en los promotores<sup>8</sup> de los genes que regula [131, 136].

La activación de las células estelares conlleva una disminución en la expresión y actividad de PPAR $\gamma$ , mientras que el tratamiento con ligando de PPAR $\gamma$  revierte el fenotipo hacia uno quiescente [35, 48, 81]. A continuación se describen sus interacciones principales.

<sup>8</sup>Región del ADN donde se inicia la transcripción de un gen particular, en donde se une la polimerasa y los factores de transcripción.

PPAR $\gamma$  es capaz de bloquear la señal de proliferación de PDGF ya que disminuye la expresión del receptor de PDGF [135]. A su vez, PDGF inhibe a PPAR $\gamma$  mediante su fosforilación por efecto de ERK1/2 [35, 49]. Además, PPAR $\gamma$  interactúa con JunD, parte del compuesto AP-1 e impide que este factor de transcripción pueda unirse al ADN, esto sin alterar la expresión de JunD [49].

PPAR $\gamma$  disminuye la expresión de COL1A1 y  $\alpha$ -SMA y su señalización puede aumentar la propia expresión de PPAR $\gamma$ , cuando ésta es inhibida por citocinas como TNF [81]. Además, reduce la expresión de CTGF, inducida por TGF- $\beta$  [114] y bloquea la señal de TGF- $\beta$  interfiriendo con la activación de Smad3 lo cual reduce la expresión de sus genes blanco, como PAI-1 y COL1A1[140]. La señal de PPAR $\gamma$  también disminuye también la producción de receptores de TGF- $\beta$  [141].

El incremento y activación de PPAR $\gamma$  en células estelares hepáticas activadas promueve la expresión de otras proteínas que también favorecen al fenotipo quiescente. SREBP1c es también un factor de transcripción importante en la regulación de la diferenciación de los adipocitos. Está presente en HSCs quiescentes, pero su expresión disminuye con la activación. La señal de PPAR $\gamma$  incrementa los niveles de SREBP1c, en parte porque aumenta también la presencia de uno de los reguladores de SREBP1c, LXR- $\alpha$  (*Liver X receptor alpha*). Además, SREBP-1c promueve también la expresión de PPAR $\gamma$  y la transición de las células estelares hepáticas hacia un fenotipo quiescente [107].

*Leptin* disminuye la expresión de SREBP-1c, además de disminuir la de PPAR $\gamma$  [107]. La inhibición de SREBP-1c ocurre ya que el receptor de *leptin* activa a p38 MAPK y a STAT3, proteínas que disminuyen los niveles de LXR- $\alpha$  y su capacidad de unión al promotor de SREBP-1c[125, 139]. Además, mediante p38 MAPK aumenta los niveles de CTNNB1 lo que resulta también en disminución de la expresión de SREBP-1c [133].

Los efectos pro-fibrogénicos promovidos por *leptin*, se contrarrestan con diversos mecanismos promovidos por *adiponectin*. Mientras que *leptin* se expresa en células estelares activadas, *adiponectin* se expresa en células quiescentes y es capaz de inducir apoptosis mediante la activación de CASP3 e inhibir la proliferación de las HSCs activas [22]. La señal de *adiponectin* se propaga mediante la activación del receptor AdipoR2, el cual activa a AMPK (*Adenosine monophosphate-activated kinase*). La presencia de *adiponectin* bloquea la activación de JAK2 por *leptin* e inhibe la actividad de TIMP-1, también cuando ésta es promovida por *leptin* [45]. AMPK, por su parte inhibe la proliferación promovida por PDGF e impide la unión de Smad2 y Smad3 con otros factores de transcripción debilitando su unión al ADN [72], disminuye la activación de STAT3 por *leptin* [46] e inhibe la señal de AKT [6]. La presencia de *adiponectin* incrementa la expresión de SREBP-1c y de PPAR $\gamma$ . De hecho, algunos de los efectos anti-fibrogénicos de PPAR $\gamma$  son mediados por la actividad de *adiponectin*, aunque el mecanismo de activación no ha sido esclarecido [104].

Las vías de señalización y eventos transcripcionales involucrados en la activación de las células estelares hepáticas forman un sistema donde diversos procesos ocurren de manera simultánea y los componentes participan en más de una vía de señalización. Ante dicha complejidad, la modelación y análisis de este sistema requieren de un formalismo que permita su simplificación y conserve sus características más representativas; las redes Booleanas tienen las propiedades adecuadas para lograr esta tarea.

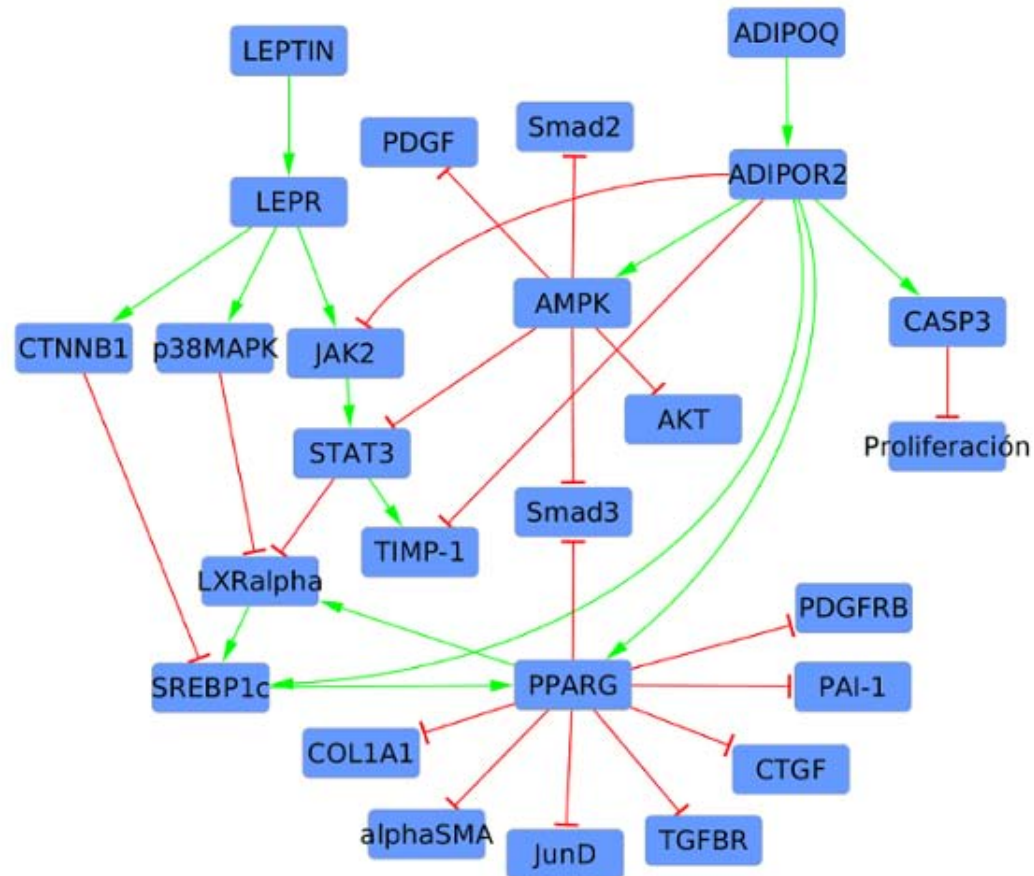


Figura 10: Gráfica de las interacciones de  $PPAR\gamma$  y *adiponectin*.  $PPAR\gamma$  es un receptor nuclear que actúa como factor de transcripción. La disminución en la expresión y actividad de  $PPAR\gamma$  está ligada con el fenotipo activo de las HSCs, mientras que cuando se tratan estas células con  $PPAR\gamma$ , se revierte el fenotipo hacia uno quiescente.  $PPAR\gamma$  es capaz de bloquear la señal de PDGF y de TGF- $\beta$  ya que disminuye la expresión de sus receptores. También disminuye la expresión de muchas proteínas pro-fibrogénicas como COL1A1, PAI-1, CTGF, Smad3, JunD, entre otras. SREBP1c es también un factor de transcripción presente en HSCs quiescentes que forma un ciclo de regulación positiva con  $PPAR\gamma$  mediante LXR- $\alpha$ . *Adiponectin* se expresa también en HSCs quiescentes y activa a AMPK, proteína que interfiere en la señal de PDGF y que inhibe a Smad2 y Smad3, además de contrarrestar los efectos de la señal de *leptin*, que disminuye la actividad tanto de LXR- $\alpha$  como la de SREBP1c.

## **Parte II. El modelo**

# Objetivos

---

El objetivo de este trabajo es construir una red Booleana que represente las vías de señalización y regulación genética principales en la activación de las células estelares hepáticas (HSCs) y la interacción de estas vías con PPAR $\gamma$ .

El modelo pretende ayudar a entender mejor este proceso biológico, integrar información de diversas fuentes y usar un lenguaje formal y computacionalmente manipulable para representar las observaciones experimentales reportadas.

Los objetivos específicos son:

- Realizar una búsqueda en las principales bases de datos de vías de señalización o redes de regulación genética relacionadas con la activación de las HSCs y el papel de PPAR $\gamma$ .
- Reunir una colección de artículos publicados que presenten resultados experimentales sobre interacción de proteínas o actividad transcripcional en la activación de las HSCs.
- Reunir una colección de artículos publicados que presenten resultados experimentales sobre las interacciones de PPAR $\gamma$  en la reversión de la activación de las HSCs.
- Identificar a los componentes biológicos que participan y sus interacciones principales; determinar la dirección de las interacciones y si su efecto es de activación o inhibición en la actividad de las proteínas o en la transcripción de genes. Construir una gráfica representando los componentes como vértices y las interacciones como aristas.
- Construir una red Booleana mediante la traducción de las aristas de la gráfica anterior a enunciados lógicos.
- Analizar la dinámica de la red Booleana construida con una previa selección de las herramientas de software y/o algoritmos necesarios para el manejo, simplificación y análisis de redes Booleanas.



# Modelos relacionados y herramientas utilizadas

---

## Modelos relacionados en la literatura

Para la construcción del modelo se realizó una búsqueda en la literatura de modelos relacionados con la fibrosis hepática y otras enfermedades en el hígado y de modelos recientes que hacen uso de redes Booleanas.

### Red Booleana de supervivencia en linfocitos T

Los linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés) son células del sistema inmune capaces de reconocer células infectadas o transformadas e inducir su muerte. Normalmente, al haber una amenaza, el número de éstas células crece y, cuando la amenaza se resuelve, muchas de estas células mueren también, dejando una pequeña población de CTLs especializadas para reconocer la misma amenaza en el futuro. En la leucemia de linfocitos grandes granulares, las CTLs escapan de la apoptosis y continúan su actividad de manera desregulada.

Zhang y colegas [138] construyeron un modelo de lógica booleana para analizar las vías de señalización que participan en la supervivencia de las CTLs en la leucemia de linfocitos grandes granulares. Realizaron una búsqueda en la literatura para construir una red que describiera el proceso de apoptosis normal en las CTLs y añadieron vértices que se conoce que están desregulados en la leucemia. Para resumir los efectos biológicos de las vías de señalización agregaron los vértices de salida: Señalización del citoesqueleto, Proliferación y Apoptosis. Modelaron las interacciones con lógica booleana y simplificaron la red utilizando NET-SYNTHESIS [56]. Con un esquema de actualización asíncrona reprodujeron el comportamiento asociado a los linfocitos sanos e implementando las desregulaciones necesarias, lograron reproducir el estado en que las células escapan de la apoptosis. Además, identificaron un subconjunto de vértices desregulados capaces de causar los demás estados aberrantes y vértices cuya activación o inactivación causó que el estado de apoptosis se encendiera. Estos últimos son potenciales blancos terapéuticos para inducir la apoptosis en los linfocitos T en el contexto de la leucemia de linfocitos grandes granulares.

Este modelo fue utilizado después para analizar los atractores del sistema y sus cuencas de atracción mediante una técnica de reducción de redes Booleanas propuesta por el grupo de investigación de Réka Albert [97]. La reducción se basa en la observación de que las redes Booleanas contienen vértices cuyos estados se estabilizan en un estado atractor después de un periodo transitorio, sin importar el esquema de actualización. El proceso para reducir la red consiste de dos pasos principales:

1. Identificar los vértices cuyo estado permanece fijo, típicamente serían los vértices de entrada, y sustituir sus variables asociadas por el valor booleano del estado fijo en las funciones de los vértices que dependen de ellos. Este paso es llamado **análisis de estados estables** y con él se obtiene un conjunto de vértices cuyos estados oscilan dados ciertos valores en los vértices de entrada y conjunto de vértices con estados fijos.

2. Eliminar vértices **mediadores**, es decir, vértices de grado dos donde el vértice de entrada del mediador pueda conectarse directamente al de salida. Eliminar también vértices irrelevantes que no tengan aristas de salida.

En la red Booleana de linfocitos T, previamente reducida con NET-SYNTHESIS, se fijaron los valores de los vértices de entrada y se ejecutaron los pasos de la reducción para obtener una red con 18 vértices. En esta red encontraron dos puntos fijos, uno asociado al estado sano y otro asociado al estado característico en la leucemia, los mismos encontrados por Zhang. Además, encontraron que la cuenca de atracción del primer punto fijo es más grande que la del segundo.

Finalmente, Zañudo y Albert desarrollaron otra técnica de reducción de redes lógicas y la aplicaron al mismo modelo [130]. Esta técnica utiliza solamente la topología de la gráfica, por lo que requiere construir una gráfica alterna donde las funciones booleanas de actualización se representen explícitamente, es decir, se agregan vértices extras para que en la gráfica pueda distinguirse si las funciones utilizan el operador de conjunción o disyunción y qué vértices están relacionados con qué operador lógico. En esta nueva gráfica se buscan componentes, llamados **componentes estables**, que tienen ciertas características topológicas que indican que los vértices en el componente se estabiliza en un estado o en un número pequeño de estados fijos. Una vez identificados, se busca determinar su influencia en el resto de la gráfica. El resultado de la reducción puede indicar que todos los vértices se estabilizan y se encuentra un punto fijo, o pueden encontrarse los vértices que no oscilan dentro de un ciclo límite. El análisis de componentes estables en la red Booleana de los linfocitos T, encontró a tres componentes estables que además tienen importancia biológica en dicho sistema.

## Modelos sobre fibrosis hepática y otras enfermedades en el hígado

El cáncer de hígado o hepatocarcinoma (HCC) es uno de los tipos de cáncer más comunes en el mundo. Las células cancerígenas aprovechan el mal funcionamiento de un proceso llamado transición epitelio mesénquima (EMT por sus siglas en inglés), donde las células epiteliales pierden sus propiedades adhesivas y se convierten en células migratorias para invadir tejido vecino y causar metástasis. En 2014, Steinway y colegas [113] realizaron varios experimentos en diferentes líneas celulares de hepatocarcinoma y encontraron que la señalización de TGF- $\beta$  es una desregulación común con un rol que cambia durante la progresión del tumor, ya que en el epitelio normal y en las etapas tempranas de la enfermedad actúa como supresor tumoral y cuando el cáncer progresa, estimula el proceso de EMT.

En dicho trabajo construyeron una red Booleana para representar la transición epitelio mesénquima impulsada por la señalización de TGF- $\beta$  con interacciones reportadas en la literatura, agregando información del mismo proceso en otros tipos celulares cuando los datos para HCC no eran suficientes. La red original contenía 70 vértices y 135 aristas y fue reducida utilizando NET-SYNTHESIS y el algoritmo propuesto en [97], mencionado anteriormente. Con esta nueva red y utilizando un enfoque de actualización asíncrona determinista, para diferenciar el tiempo en las interacciones entre proteínas y las interacciones que requieren expresión de un gen, encontraron que la red se mantiene en el fenotipo epitelial al establecer los valores de los vértices según la información experimental, pero con la señal ininterrumpida de TGF- $\beta$ , la red alcanza un único punto fijo, el estado asociado a EMT. Además, al realizar la búsqueda de componentes estables encontraron *feedback-loops* cuya presencia es suficiente para estabilizar el sistema en su punto fijo, proponiendo

posibles blancos terapéuticos para ser intervenidos en análisis experimentales.

La fibrosis hepática es una de las condiciones patológicas de la hepatopatía alcohólica o etílica (ALD por sus siglas en inglés), producida por consumo excesivo de alcohol. Todos los tipos celulares y procesos biológicos detallados en el capítulo anterior participan en esta enfermedad y, al ser la producción desregulada de colágena en las células estelares hepáticas un suceso clave en la fibrosis, lo es también en la ALD. La investigación de Nieto [84] tiene como objetivo determinar la red de regulación de proteínas involucrada en la secreción de colágena I en las células estelares hepáticas debido al consumo de alcohol. Utiliza espectroscopía de masas y una metodología propia de la biología de sistemas para analizar HSCs y determinar perfiles de expresión de proteínas en diversas condiciones experimentales. Ha descrito varias de las vías de señalización que participan con representaciones que no incluyen gráficas o redes Booleanas.

El papel regulatorio de los microRNAs, RNAs pequeños pero que no codifican para proteínas, se estudia en cada vez más contextos y la activación de las HSCs no es la excepción. No encontramos evidencia suficiente para incluirlos en las vías de señalización relacionadas con las características del fenotipo activo de las células estelares, pero se sabe que la expresión de algunos microRNAs cambia durante el proceso. Utilizando una red de Petri, Kuttippurathu y su equipo construyeron un modelo para representar los eventos de señalización que llevan a la baja expresión de miR-146a y el incremento de miR-21 en HSCs activas [65]. Las redes de Petri son otro formalismo también basado en gráficas donde los componentes y las interacciones se modelan con dos tipos diferentes de vértices. Modelaron las interacciones con dinámica continua, ajustando manualmente los parámetros cinéticos. Las vías de señalización principales en la activación de las HSCs no fueron capaces de explicar la diferenciación en la regulación de miR-21 y miR-146a, por lo que agregaron otros vértices regulatorios para simular las observaciones obtenidas de manera experimental. Concluyeron que no hay evidencia suficiente con respecto a la cinética de la activación de las células estelares hepáticas y que su modelo tiene que ser expandido e incluir otras vías de señalización y mecanismos regulatorios de microRNAs.

Esta serie de trabajos ejemplifican algunas técnicas utilizadas en el análisis de sistemas biológicos y además muestran cómo el comportamiento dinámico del sistema se asocia a características biológicas o fenotipos celulares. El que sean relativamente recientes (desarrollados casi todos hace menos de cinco años), habla del interés de la comunidad científica en la biología de sistemas y en la modelación con redes Booleanas.

## Herramientas utilizadas

### NET-SYNTHESIS

NET-SYNTHESIS es una herramienta que se utiliza para simplificar redes Booleanas. NET-SYNTHESIS tiene como objetivo encontrar, a partir de una gráfica construida con información sobre interacciones indirectas entre componentes biológicos, la gráfica con menos aristas que sea consistente con las observaciones experimentales. Esto no significa que las vías de señalización realmente tengan el menor número de interacciones posibles, sino que se pretende minimizar inferencias falsas provenientes de las observaciones indirectas y obtener una gráfica lo más parecida posible a un árbol. El software se describe en [56] y el algoritmo de forma detallada en [9, 10], aquí se denotan las ideas principales.

NET-SYNTHESIS utiliza un formato donde las relaciones de activación se denotan

como  $A \rightarrow B$ , las de inhibición como  $A \dashv B$  y las interacciones dobles como  $A \rightarrow (B \dashv C)$ . Además, al agregar la etiqueta  $Y$ ,  $A \rightarrow B Y$ , las interacciones se marcan como *aristas críticas* las cuales permanecerán en la red después de su simplificación.

Para la descripción del algoritmo se requieren las siguientes definiciones. Dada la gráfica dirigida  $G = (V, E)$ , con una función de etiquetación de vértices  $w : E \mapsto \{0, 1\}$ , donde la etiqueta 0 en  $u \xrightarrow{0} v$  significa  $u$  activa a  $v$  y la etiqueta 1 en  $u \xrightarrow{1} v$ ,  $u$  inhibe a  $v$ :

- La *paridad* de una trayectoria  $P$  del vértice  $u$  al vértice  $v$  es  $\sum_{e \in P} w(e) \pmod{2}$ . Si un  $P$  tiene paridad 0, es llamada trayectoria de paridad par y si tiene paridad 1, trayectoria de paridad impar.
- $u \xrightarrow{x} v$  denota una trayectoria de  $u$  a  $v$  de paridad  $x \in \{0, 1\}$ . Si la paridad no tiene importancia, se denota  $u \Rightarrow v$ , mientras que una arista se representa como  $u \xrightarrow{x} v$  o  $u \rightarrow v$ .
- Para un subconjunto de las aristas  $E' \subseteq E$ ,  $recheable(E')$  es el conjunto de tripletas ordenadas  $(u, v, x)$  tal que existe una trayectoria  $u \xrightarrow{x} v$  en la subgráfica  $(V, E')$ .
- Para cualquier vértice  $v$ ,  $in(v) = \{(u, x) | u \xrightarrow{x} v, x \in \{0, 1\}\} \setminus \{v\}$  y  $out(v) = \{(u, x) | v \xrightarrow{x} u, x \in \{0, 1\}\} \setminus \{v\}$

El algoritmo consiste esencialmente en la resolución de dos problemas: reducción transitiva binaria (BTR por *binary transitive reduction*) y contracción de pseudo-vértices (PVC *pseudo-vertex collapse*).

El problema de reducción transitiva binaria se define de la siguiente manera. Dada una gráfica dirigida  $G = (V, E)$  con una función de etiquetación de vértices  $w : E \mapsto \{0, 1\}$  y un conjunto de aristas críticas  $E_{críticas} \subseteq E$ , encontrar una subgráfica  $G' = (V, E')$  donde  $E_{críticas} \subseteq E'$  y  $recheable(E') = recheable(E)$ , con el objetivo de minimizar  $|E'|$ . La solución, exacta o aproximada, a este problema no es única.

A su vez, el problema de contracción de pseudo-vértices tiene la siguiente definición. Dada una gráfica dirigida  $G = (V, E)$  con una función de etiquetación de vértices  $w : E \mapsto \{0, 1\}$  y un subconjunto de vértices  $V' \subset V$  llamado pseudo-vértices, donde:

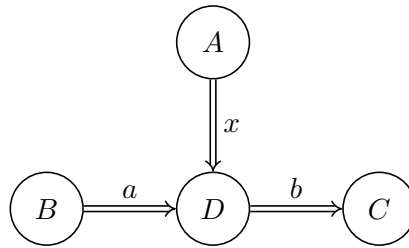
- La contracción de vértices se permite si ambos son pseudo-vértices y si  $in(u) = in(v)$  y  $out(u) = out(v)$ .
- Contraer los vértices  $u$  y  $v$ , crea un nuevo vértice  $w$ , en el que cada arista de entrada, y de salida, de  $u$  o  $v$  se convierte en arista de entrada, y de salida, de  $w$ ; elimina todas las aristas paralelas que resulten de la contracción y también elimina  $u$  y  $v$ .

La solución es la gráfica  $G'' = (V'', E'')$  obtenida de  $G$  mediante una serie de operaciones de contracción de vértices y el objetivo es minimizar  $|V''|$ .

Los pasos en la reducción de la red son los siguientes:

1. Construir una gráfica con las interacciones de tipo  $A \xrightarrow{0} B$  y  $A \xrightarrow{1} B$ , marcando las aristas críticas.
2. Resolver el problema de reducción transitiva binaria en dicha gráfica.
3. Para cada una de las relaciones indirectas de tipo  $A \xrightarrow{x} (B \xrightarrow{y} C)$  donde  $x, y \in \{0, 1\}$ , agregar nuevos vértices o aristas en la gráfica dependiendo de los siguientes casos:

- Si  $B \xrightarrow{y} C \in E_{críticas}$ , agregar la arista  $A \xrightarrow{x} B$
- Si no existe una subgráfica de la forma:



Para algún vértice  $D$  y donde la arista  $B \xrightarrow{y} C$  se divide en dos trayectorias dependiendo de su paridad: si  $y = 0$ , entonces  $a = 0$  y  $b = 0$ , si  $y = 1$ , entonces  $a = 0$  y  $b = 1$ . Es decir, si no existe una subgráfica que explique la relación indirecta, se agrega el pseudo vértice  $P$  y tres aristas:  $A \xrightarrow{x} P$ ,  $B \xrightarrow{a} P$  y  $P \xrightarrow{b} C$ , con los valores de  $a$  y  $b$  previamente mencionados.

4. Resolver el problema de contracción de pseudo-vértices en esta gráfica.
5. Resolver nuevamente reducción transitiva binaria para eliminar aristas redundantes creadas por la contracción de pseudo-vértices.

Los pseudo-vértices se agregan utilizando un algoritmo similar al algoritmo Floyd-Warshall para determinar si el vértice  $u$  tiene un camino al vértice  $v$  y la paridad de ese camino. En su versión original este algoritmo encuentra los caminos más cortos entre todos los pares de vértices en una gráfica con pesos en las aristas. Los pesos pueden ser positivos o negativos pero la gráfica no debe tener ciclos negativos. El tiempo de ejecución de este algoritmo es  $O(|V|^3)$ .

Los autores no hacen mención de un algoritmo en particular para resolver el problema de contracción de pseudo-vértices, pero prueban que puede ser resuelto en tiempo polinomial partiendo los vértices en clases de equivalencia donde dos vértices están en la misma clase si  $in(u) = in(v)$  y  $out(u) = out(v)$ . Al colapsar  $u$  y  $v$  y reemplazarlos por  $w$ , éste permanece en la misma partición. Por lo tanto, la solución consiste en colapsar los vértices de cada clase de equivalencia.

Por su parte, el problema de reducción transitiva binaria es NP-Completo. Una gráfica dirigida fuertemente conexa<sup>9</sup>,  $G = (V, E)$  con  $n$  vértices donde  $E_{críticas} = 0$  y con todas sus etiquetas de aristas con valor 0, tiene un ciclo Hamiltoniano si la solución del problema de reducción binaria transitiva es una gráfica con  $n$  vértices. Con estas características el problema se llama también *minimum equivalent digraph* (MED).

Los autores prueban que existe un algoritmo polinomial para resolver el problema si la gráfica es una gráfica dirigida sin ciclos o si la gráfica tiene ciclos de tamaño máximo 3. Además, desarrollan un algoritmo de aproximación *greedy* con factor 3. Los algoritmos de aproximación proveen una solución aproximada en tiempo polinomial a problemas de optimización que es, a lo más,  $\alpha$  veces el valor de la solución óptima, donde  $\alpha$  es el factor del algoritmo. El algoritmo 1 contiene los pasos del algoritmo de aproximación.

La implementación, al igual que el procedimiento de añadir pseudo-vértices, utiliza un algoritmo similar al Floyd-Warshall, por lo que su tiempo de ejecución es  $O(|V|^3)$ . Para resolver el problema en un tiempo aceptable, se toman dos enfoques de implementación:

<sup>9</sup>Donde para cada par de vértices  $u, v$  existe un camino de  $u$  a  $v$  y un camino de  $v$  a  $u$

---

**Algoritmo 1** Algoritmo para resolver reducción transitiva binaria

---

**Definición:** Una arista  $u \xrightarrow{x} v$  es redundante si existe una trayectoria  $u \xrightarrow{x} v$   
**while** exista una arista redundante **do**  
    eliminar la arista redundante  
**end while**

---

1. Si la gráfica de entrada tiene, a lo más  $N$  vértices ( $N=150$ , según los autores), se aplica el algoritmo greedy en toda la gráfica. En cada iteración se elige una nueva arista no crítica  $e = u \xrightarrow{x} v$ , se elimina tentativamente y se busca la trayectoria  $u \xrightarrow{x} v$  en la nueva gráfica. Si se encuentra, la arista se elimina. Si no, se mantiene y se marca para no ser seleccionada nuevamente. El procedimiento termina cuando ya no hay aristas por seleccionar.
2. En gráficas con más de  $N$  vértices se buscan las componentes fuertemente conexas y se aplica el primer enfoque en cada componente conexa y se utiliza otro procedimiento para unir los resultados e identificar las aristas restantes que pueden ser eliminadas. Si una componente conexa tiene muy pocos vértices, la solución se busca de forma exhaustiva.

Además, en ambos enfoques, el algoritmo Floyd-Warshall se detiene cuando se encuentra la trayectoria de  $u$  a  $v$  y la selección de la arista siguiente a ser eliminada se realiza de forma aleatoria.

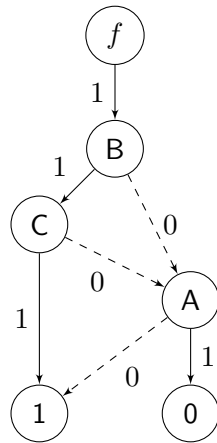
## GenYsis

El software GenYsis [1] sirve para realizar el cómputo de atractores en una red Booleana. Este software lo distribuye el Swiss Institute of Bioinformatics y la descripción del algoritmo se encuentra en [39], aquí se resaltarán sus características principales.

El algoritmo utiliza una estructura de datos llamada diagrama de decisión binaria (BDD por sus siglas en inglés) [20] para representar de forma compacta el espacio de estados de la red Booleana y analizar su dinámica de forma eficiente.

Un diagrama de decisión binaria es una gráfica dirigida acíclica que consiste en un vértice raíz, varios vértices intermedios de decisión y dos vértices terminales, llamados terminal-0 y terminal-1. Cada variable en la función Booleana representa un vértice de decisión en la gráfica y cada vértice tiene dos aristas de salida para caracterizar a los valores de la variable, 1 y 0. Todas las trayectorias desde el vértice raíz hasta el vértice terminal-1 contienen las evaluaciones de las variables para las cuales la función es verdadera. Es relativamente sencillo escalar el tamaño del BDD con el tamaño de la función y todas las operaciones lógicas se ejecutan en tiempo polinomial; además, la estructura de datos no requiere la construcción explícita de una tabla de verdad ya que puede derivarse directamente de la función booleana.

El BDD para representar la función booleana  $f = \neg A \vee (B \wedge C)$  sería:



En su versión reducida, la que se utiliza en GenYsis, un BDD es único para una expresión Booleana.

En GenYsis  $T(V_t, V_{t+1})$  es el BDD que representa la transición de la red Booleana del estado en el tiempo  $t$  al estado en el tiempo  $t + 1$ . El algoritmo puede manipular la dinámica de la red utilizando el enfoque de actualización asíncrono y síncrono. En el caso de actualización asíncrona,  $T_i(V_t, V_{t+1})$  simboliza cada posible estado sucesor y su relación está dada por:

$$T(V_t, V_{t+1}) = T_0(V_t, V_{t+1}) \vee T_1(V_t, V_{t+1}) \vee \dots \vee T_N(V_t, V_{t+1})$$

Dependiendo del esquema de actualización, el algoritmo crea un diagrama de decisión binaria que incluye a las variables en el tiempo  $t$  en el vector  $v$  y las variables en el tiempo  $t + 1$  en el vector  $v'$ . Los caminos desde el vértice raíz hasta el terminal-1 son congruentes con las reglas de actualización para los componentes de la red Booleana y en cada paso de tiempo se toman en cuenta aquellos que corresponden con los valores de las variables en  $v$  para obtener los valores en  $v'$  y simular el paso de  $t$  a  $t + 1$ . En el texto original se muestra un ejemplo utilizando el esquema asíncrono general.

Para la explicación del algoritmo que realiza el cómputo de los atractores de la red Booleana, los autores hacen uso de las siguientes definiciones:

- La imagen delantera, *forward image*,  $I_f(S(V_t))$  es el conjunto de sucesores inmediatos de los estados en  $S(V_t)$  en la gráfica de transición de estados.
- La imagen hacia atrás, *backward image*,  $I_b(S(V_t))$  es el conjunto de predecesores inmediatos de los estados en  $S(V_t)$  en la gráfica de transición de estados.
- Los estados alcanzables hacia adelante (FR por *forward reachable states*),  $FR(S_0)$ , son los estados que pueden ser alcanzados desde  $S_0$  computando la imagen delantera en la transición  $T(V_t, V_{t+1})$  hasta que no pueden alcanzarse nuevos estados en la red Booleana.
- Los estados alcanzables hacia atrás (BR por *backward reachable states*),  $BR(S_0)$ , son los estados en  $T(V_1, V_{t+1})$  cuyos estados alcanzables hacia adelante contienen a  $S_0$ .
- Los estados dentro de los atractores de la red Booleana son aquellos en el conjunto  $SS(V_t)$  que tienen las dos propiedades siguientes:

1. Su imagen delantera  $I_f(SS(V_t))$  es igual a  $SS(V_t)$ . Es decir, en los siguientes pasos de tiempo no se visitan estados fuera del atractor.
2. Para todos los estados en  $SS(V_t)$ , si un estado es alcanzado una vez, la probabilidad de visitarlo nuevamente es 1.

Además, el algoritmo está basado en dos teoremas:

**Teorema.** Un estado  $i \in S$  forma parte de un atractor si y solo si  $FR(i) \subseteq BR(i)$ , de otro modo es un estado transitorio.

**Teorema.** Si el estado  $i \in S$  es transitorio, entonces todos los estados en  $BR(i)$  son transitorios. Si  $i$  forma parte de un atractor, entonces los estados  $FR(i)$  forman también parte del atractor; por lo tanto, los estados en el conjunto  $\{BR(i) - FR(i)\}$  son todos transitorios.

En el algoritmo 2 se presentan las operaciones necesarias para computar los estados alcanzables hacia adelante y hacia atrás iniciando por el estado  $S_0$  en el espacio de estados  $T$ .  $FS^k$  es el conjunto de estados en la frontera, es decir los últimos visitados en la  $k$ -ésima iteración, mientras que  $RS^k$  es el conjunto de estados alcanzables. En cada iteración se computan nuevos estados en la frontera, tomando su imagen hacia adelante o su imagen hacia atrás, sin que éstos hayan sido visitados previamente y la frontera actual pasa a ser parte de los estados alcanzables. Las iteraciones terminan cuando no hay estados en la imagen hacia adelante o hacia atrás que no hayan sido visitados previamente.

---

**Algoritmo 2** Algoritmo para computar los estados alcanzables hacia adelante y hacia atrás.

---

```

function forward_set( $S_0, T$ )
  /* backward_set( $S_0, T$ ) */
   $RS^{(0)} \leftarrow \emptyset$ 
   $FS^{(0)} \leftarrow \{S_0\}$ 
   $k \leftarrow 0$ 
  while  $FS^{(k)} \neq \emptyset$  do
     $FS^{(k+1)} = I_f(FS^{(k)})(V_{t+1} \leftarrow V_t) \wedge \overline{RS^{(k)}}$ 
    /*  $FS^{(k+1)} = I_b(FS^{(k)})(V_t \leftarrow V_{t+1}) \wedge \overline{RS^{(k)}}$  */
     $RS^{(k+1)} = RS^{(k)} \vee FS^{(k+1)}$ 
     $k \leftarrow k + 1$ 
  end while
  return ( $FR(S_0) \leftarrow RS^{(k)}$ )
  /* return ( $BR(S_0) \leftarrow RS^{(k)}(V_{t+1} \leftarrow V_t)$ ) */
end function

```

---

El algoritmo 3 computa los atractores de la red Booleana con espacio de estados  $T$ . En cada iteración se selecciona un estado inicial,  $s$ , y se computan sus estados alcanzables hacia adelante  $FR(s)$  y hacia atrás  $BR(s)$  con el algoritmo 2. Se examina si los conjuntos obtenidos cumplen con la condición del primer teorema y si es así,  $s$  pertenece a un atractor por lo que todos los estados alcanzables hacia adelante se marcan como parte del atractor y el resto como estados transitorios. De otro modo, el estado elegido y todos los estados previos se declaran como transitorios. El espacio de búsqueda se reduce en cada iteración al remover los estados que ya han sido visitados,  $s$  y  $BR(s)$  y el proceso se repite hasta que el espacio de estados se explora en su totalidad.

La función *estado\_inicial* selecciona un estado candidato a ser parte de un atractor. De la representación en BDD se seleccionan las variables en  $V_t$  de una trayectoria hacia



1-terminal para formar el estado inicial  $s$ . Se computa el conjunto de estados alcanzables hacia adelante a partir de  $s$  y se toma el último visitado. Esto porque cualquier estado en la frontera de la  $k$ -ésima iteración tiene un conjunto alcanzable hacia atrás más grande que cualquier otro estado en las anteriores  $k - 1$  iteraciones. Por lo tanto, el número de iteraciones necesarias para analizar el espacio de estados será menor.

GenYsis está implementado en  $C++$  y en el texto original se analiza su tiempo de ejecución y la memoria requerida por el algoritmo al utilizarlo para analizar grandes redes Booleanas de más de mil vértices.

---

**Algoritmo 3** Algoritmo para computar atractores en la red Booleana

---

```

function all_steady_states( $T$ )
   $T' \leftarrow T$ 
  while  $T' \neq \emptyset$  do
     $s \leftarrow \text{initial\_state}(T')$ 
     $FR(s) \leftarrow \text{forward\_set}(s, T')$ 
     $BR(s) \leftarrow \text{backward\_set}(s, T')$ 
    if  $FR(s) \wedge \overline{BR(s)} = \emptyset$  then
      marcar  $FR(s)$  como atractor
      marcar  $BR(s) \wedge \overline{FR(s)}$  como estados transitorios
    else
      marcar  $s \vee BR(s)$  como estados transitorios
    end if
     $T' \leftarrow T' \wedge \overline{s \vee BR(s)}$ 
  end while
end function

function initial_state( $T$ )
   $P = \text{camino\_aleatorio\_a\_1\_terminal}(T)$ 
   $s(V_t) = \exists_{v \in V_t} P$ 
   $RS^{(0)} \leftarrow \emptyset$ 
   $FS^{(0)} \leftarrow \{s\}$ 
   $k \leftarrow 0$ 
  while  $FS^{(k)} \neq \emptyset$  do
     $FS^{(k+1)} = I_f(FS^{(k)})(V_{t+1} \leftarrow V_t) \wedge \overline{RS^{(k)}}$ 
     $RS^{(k+1)} = RS^{(k)} \vee FS^{(k+1)}$ 
     $k \leftarrow k + 1$ 
  end while
   $s = \text{camino\_aleatorio\_a\_1\_terminal}(FS^{(k-1)})$ 
end function

```

---

# Un modelo Booleano para $PPAR\gamma$ y la activación de células estelares

## La Gráfica

Para construir la gráfica de las interacciones en la activación de las células estelares hepáticas (HSCs) y  $PPAR\gamma$  primero se realizó una búsqueda en las principales bases de datos que almacenan redes biológicas: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)[3] y WikiPathways [5]; además, buscamos las interacciones de  $PPAR\gamma$  en STRING [4]. La figura 11 muestra las interacciones de dicha proteína con 20 componentes vecinos.

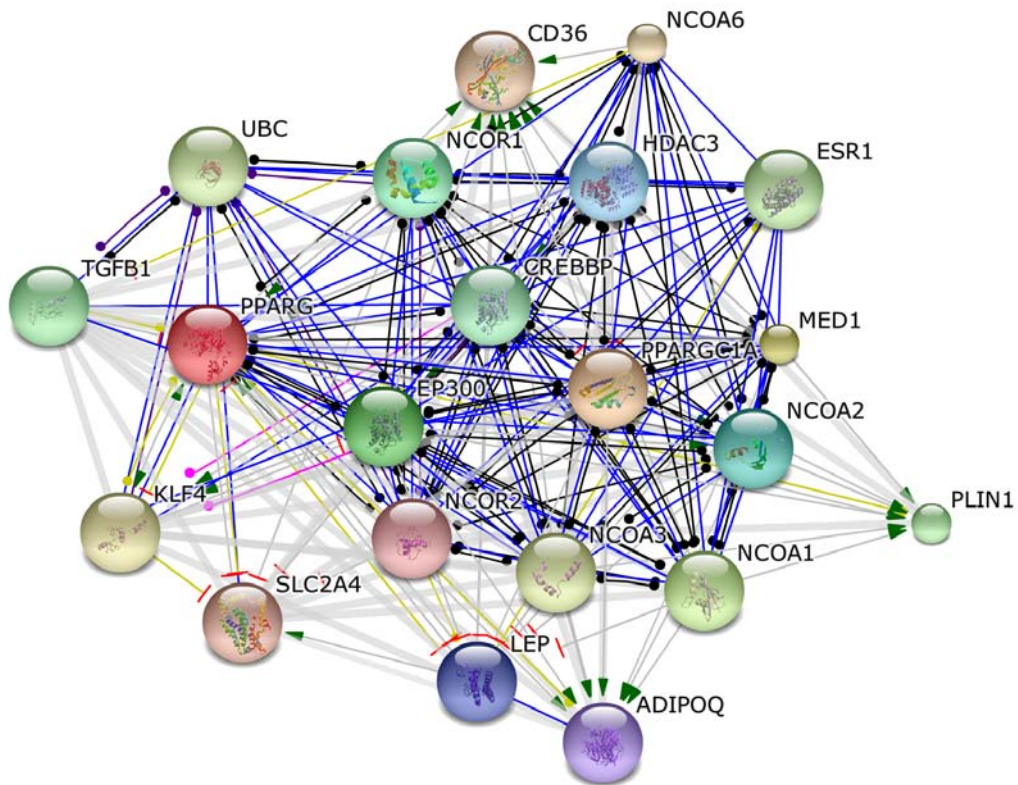


Figura 11: Gráfica con interacciones de  $PPAR\gamma$  registradas en STRING [4]. Los vértices contienen la estructura 3D de las proteínas. Las aristas denotan interacciones entre proteínas y se distingue su tipo y efecto. Éstas terminan en punta de flecha cuando es una interacción con efecto positivo, en T cuando el efecto es negativo y en un círculo pequeño si el efecto no se conoce. Los colores indican el tipo de interacción: azul para unión, verde denota activación, rojo para inhibición, amarillo para regulación transcripcional, negro para reacción y gris para otro tipo de asociación como co-ocurrencia en una vía de señalización de bases de datos manualmente curadas.

En KEGG, WikiPathways y Reactome no se encontró información que estuviera relacionada con las células estelares hepáticas y, al no conocer con exactitud las vías de señalización que son comunes a otros tipos celulares, decidimos no integrar vías de otros tipos celulares. En STRING cada interacción tiene asociada la publicación de la cual se extrae, pero fue rápidamente visible que la tarea de filtrar las interacciones por tipo celular o condición biológica tomaría tiempo considerable. Por lo tanto, se realizó una búsqueda en la literatura para construir una descripción detallada del proceso de activación de las HSCs tal que fuera sencillo traducirla a una gráfica con los componentes representados por vértices y sus interacciones con aristas. Esta descripción se encuentra en el segundo capítulo de este trabajo.

La gráfica fue transformada a una red Booleana. Las aristas se convirtieron en enunciados lógicos utilizando los operadores booleanos de conjunción, disyunción y negación, según las relaciones sugeridas por las publicaciones consultadas. Para etiquetar los vértices que corresponden a genes o proteínas se utilizaron los *Gene ID*, obtenidos de la base de datos Gene del National Center for Biotechnology Information (NCBI) [2].

La gráfica extendida está formada por 67 vértices y 127 aristas. Distinguimos tres categorías de vértices de acuerdo a la localización de los componentes biológicos a los que hacen referencia: *Extracelular*, *Intracelular* y *Receptor*. Las categorías pueden distinguirse en la figura 12 porque los vértices tienen forma de rombos, círculos y triángulos, respectivamente. Además, se añadieron 4 vértices con categoría *Proceso biológico*: Atracción de leucocitos, Contractilidad celular, Expresión de alphaSMA, Fibrogénesis y Proliferación. Estos vértices representan las principales características biológicas de las células estelares hepáticas (HSCs) con fenotipo activo y son los vértices de salida en la gráfica.

La gráfica tiene 5 vértices de entrada, es decir, componentes que no son regulados por otros: ADIPOQ, LEPTIN, PDGF, TGFB y TNF. Son señales que provienen del exterior de la célula y, con excepción de ADIPOQ, son los principales promotores de la activación de las HSCs.

En las aristas pueden distinguirse también 4 categorías: *Activa*, *Inhibe actividad*, *Promueve expresión* y *Disminuye expresión*, que diferencian si la interacción entre los componentes modifica la actividad de la proteína o la expresión del gen. La lista de vértices y aristas se encuentran en las dos primeras secciones de los **Anexos** donde también se incluye la fuente principal de donde se obtuvo la interacción y si la publicación menciona una interacción física entre los componentes.

La reducción con NET-SYNTHESIS resultó en una gráfica con el mismo número de vértices y con 96 aristas. Se marcaron como aristas críticas las interacciones que son recurrentemente mencionadas en la bibliografía, además de las interacciones entre PPAR $\gamma$  y sus vértices vecinos. Con esto se evitó que las interacciones principales en el proceso biológico fueran descartadas por el algoritmo de NET-SYNTHESIS. En el formato de esta herramienta se distinguen solamente interacciones de activación e inhibición, así que, a partir de este paso, las etiquetas de *Activa* y *Promueve expresión* se conjuntaron como *activación* y las de *Disminuye expresión* e *Inhibe actividad* como *inhibición*. La lista de interacciones que sirvieron de entrada para NET-SYNTHESIS está en la sección tres de los **Anexos**.

El siguiente paso en la simplificación fue eliminar los vértices mediadores. Consideramos vértices mediadores a los vértices de grado 2 que no juegan un papel primordial en el proceso biológico y sus vértices de destino tienen enunciados lógicos donde solamente participan los vértices mediadores.

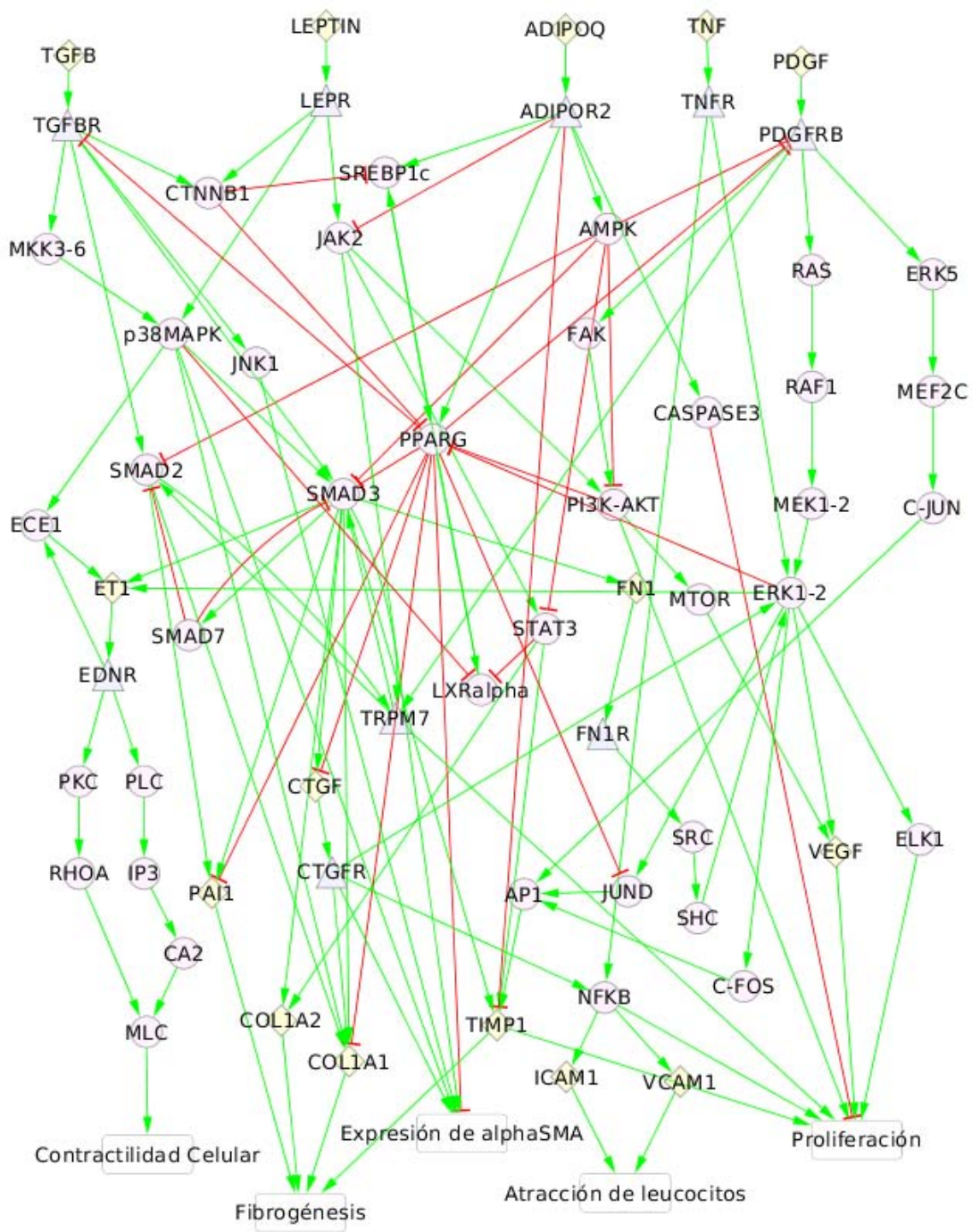


Figura 12: Gráfica con interacciones relevantes en la activación de las células estelares hepáticas e interacciones de PPAR $\gamma$ . Se distinguen tres categorías de vértices de acuerdo a la localización de los componentes biológicos: *Extracelular*, *Intracelular* y *Receptor*; con forma de rombos, círculos y triángulos respectivamente. Las aristas color verde y punta de flecha significan *Activa* o *Promueve expresión* dependiendo si la interacción modifica la actividad de la proteína o la expresión del gen, mientras que las aristas color rojas y forma en T significan *Inhibe actividad* y *Disminuye expresión*. La lista de vértices y aristas se encuentran en las dos primeras secciones de los **Anexos**.

Se simplificaron los enunciados booleanos de la siguiente manera:

$$\begin{array}{ccc} B = A & B = A & B = \neg A \\ C = B & C = \neg B & C = B \\ \hline C = A & C = \neg A & C = \neg A \end{array}$$

La gráfica reducida está formada por 38 vértices y 65 aristas; se presenta en la figura 13.

El algoritmo de NET-SYNTHESIS busca la gráfica con menos aristas que preserve las interacciones críticas y los efectos desencadenados desde los vértices de entrada hasta los vértices de salida. Es decir, elimina caminos redundantes. Entre algunas de las diferencias visibles entre la gráfica extendida y la gráfica reducida encontramos que TNF ha pasado a ser un represor directo de PPARG, sin tener ya influencia en la Atracción de leucocitos. LEPTIN también tiene un papel central en la inhibición de PPARG ya que reprime a su activador, LXRalpha; mientras que su responsabilidad en el proceso de Contractilidad celular ha sido cedida a TGFβ. Por lo tanto, TNF y LEPTIN quedan como señales inhibitoras de PPARG. PDGF y TGFβ se encargan de activar los vértices de salida, es decir, propician el fenotipo activo y ADIPOQ tiene como principal función la activación de PPARG.

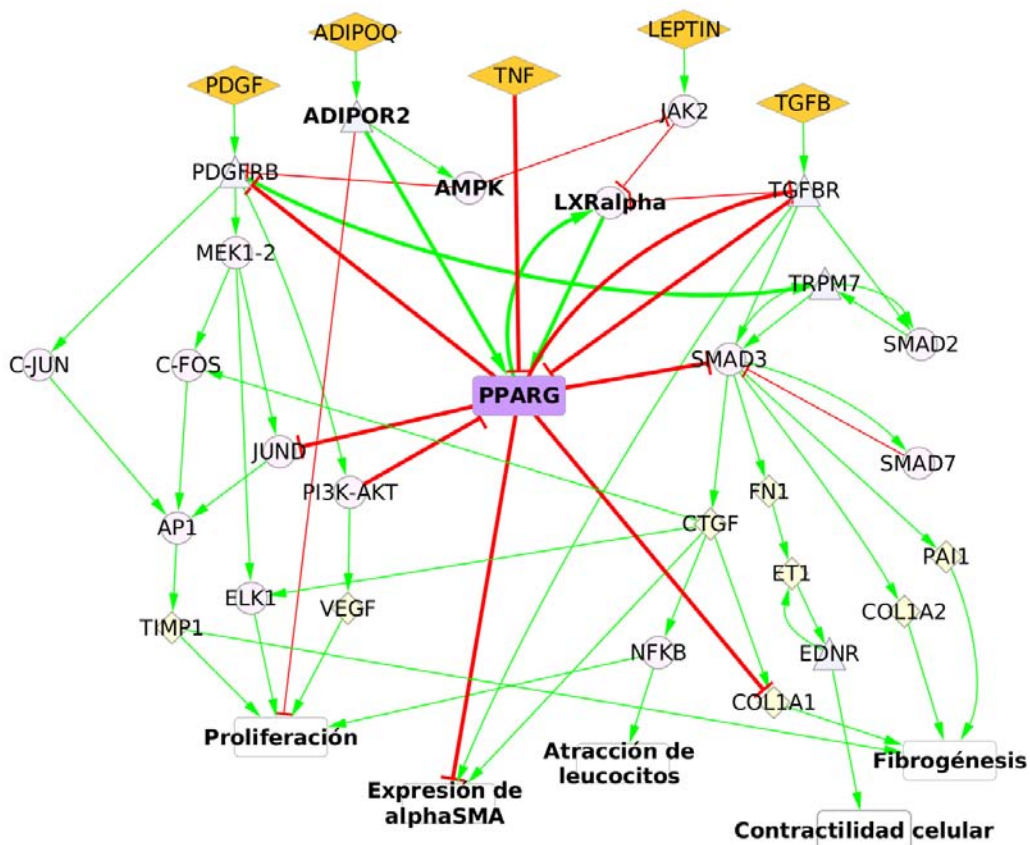


Figura 13: Gráfica reducida mediante NET-SYNTHESIS y contracción de vértices. Se preservan las categorías de los vértices utilizadas en la gráfica anterior. Las aristas verdes denotan una interacción de activación y las rojas de inhibición. Se resaltan los vértices de entrada en amarillo y las interacciones de PPARG.

## Análisis dinámico de la red Booleana

Para las simulaciones de la red Booleana se utilizó BooleanNet[7], una librería para modelar redes Booleanas, y código en Python. Todas las simulaciones utilizaron el esquema de actualización síncrono y se estableció que los vértices de entrada deben mantener su estado inicial. Los enunciados lógicos que regulan la dinámica de la red se encuentran en la cuarta sección de los **Anexos**.

Tomando en cuenta únicamente los valores de los vértices de salida: Atracción de leucocitos, Contractilidad celular, Expresión de alphaSMA, Fibrogénesis y Proliferación, definimos tres estados estables. El estado de **activación total** es en el que todos los vértices tienen un valor de 1. El estado de **activación parcial** forma parte de un ciclo límite donde hay un conjunto de vértices cuyos valores oscilan entre 1 y 0 y otro conjunto con valores estables en 1. Finalmente, en el **estado quiescente** todos los vértices de salida tienen valor 0.

La búsqueda de atractores en la red Booleana utilizando GenYsis concluyó que la red tiene 92 atractores: 32 puntos fijos, 18 ciclos de tamaño dos y 42 ciclos de tamaño cuatro. Todos los puntos fijos son representantes del estado quiescente. Es decir, los vértices de salida están apagados. Puede observarse que PPARG se encuentra activo en 24 de dichos puntos fijos. Los ciclos de tamaño dos también están asociados al estado quiescente y se generan por la activación alternante de PPARG y LXRalpha o la de TRPM7 y SMAD2. Por otro lado, los ciclos de tamaño cuatro representan estados de activación parcial.

Una hecho interesante es la ausencia del estado de activación total en el conjunto de atractores alcanzados por la red. Este estado no aparece ni siquiera con las condiciones iniciales que mejor reflejan las señales pro-activación en las células estelares hepáticas que son donde los vértices de entrada tienen los valores ADIPOQ=0, LEPTIN=1, PDGF=1, TGF $\beta$ =1 y TNF=1.

Al agrupar a los atractores donde diferentes combinaciones en los vértices de entrada generan el mismo estado para los vértices restantes, encontramos que los 32 puntos fijos pueden agruparse en siete, los 18 ciclos de tamaño dos en cinco y los 42 ciclos de tamaño cuatro en 16.

En la figura 14 se muestran los puntos fijos agrupados, con las combinaciones en los vértices de entrada que los generan.

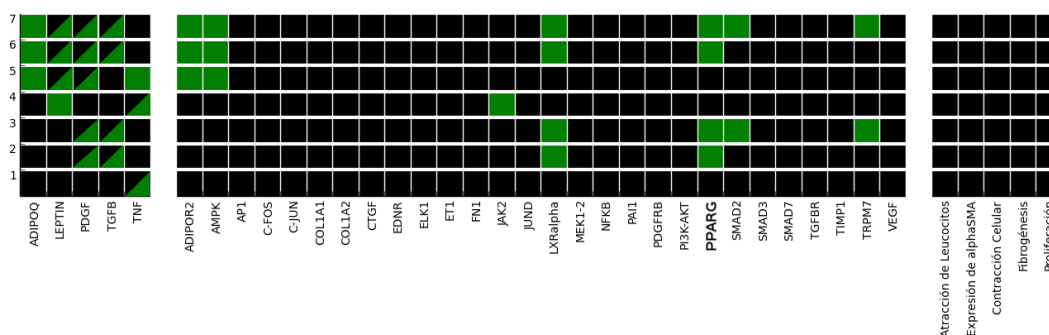


Figura 14: Puntos fijos de la red Booleana. Los 32 puntos fijos están agrupados según las combinaciones en los vértices de entrada. Los cuadros negros denotan valor 0 y los verdes valor 1. Los cuadros mitad negro, mitad verde, indican que los puntos fijos alcanzados por el sistema comparten los valores para los componentes restantes pero difiere el valor del vértice en cuestión.

## SMAD7 es un switch entre el estado de activación parcial y el estado de activación total

Como ya se mencionó, las condiciones iniciales que mejor expresan las señales que reciben las HSCs para su activación, no fijan el estado de los vértices de salida en 1, es decir, no llevan a la activación total. El atractor que resulta con ADIPOQ=0, LEPTIN=1, PDGF=1, TGFB=1 y TNF=1 como valores en los vértices de entrada es un atractor cíclico de tamaño 4, donde los procesos de Expresión de alphaSMA y Proliferación están siempre encendidos, mientras que Atracción de Leucocitos, Contractilidad celular y Fibrogénesis fluctúan entre encendido y apagado, formando un estado de activación parcial.

Para entender mejor la naturaleza de este atractor se realizó su análisis de estados estables. Como se explicó en el capítulo anterior, consiste en fijar los estados de los vértices de entrada y sustituir de forma sucesiva los vértices con valores estables en las funciones que dependen de ellos. El resultado de estas operaciones arroja un conjunto de vértices cuyo valor se estabiliza después de varios pasos de tiempo, y vértices con valores que alternan entre 1 y 0.

El análisis encontró que un total de 20 vértices, además de los 5 de entrada, se estabilizan en un valor, dejando 13 vértices con estados oscilantes. Los  $2^{13}$  estados del sistema son un fragmento de la cuenca de atracción del ciclo límite y a ellos convergerían los estados restantes. La gráfica que se muestra en la figura 15 contiene el diagrama de estados del fragmento de la cuenca de atracción mencionado. Cada vértice es un estado del sistema y éstos están conectados por una arista si son estados consecutivos en la red Booleana.

El ciclo en el atractor se genera debido a la actividad de SMAD3 y SMAD7. En las células estelares hepáticas, cuando TGF- $\beta$  se une a su receptor, SMAD2 y SMAD3 se activan para modificar la expresión de varios genes, entre ellos SMAD7. Esta proteína es también capaz de unirse al receptor de TGF- $\beta$  e impedir la activación de SMAD2 y SMAD3, terminando con la señal pro-fibrogénica de TGF- $\beta$ . Durante la fibrosis hepática crónica, no se incrementa la expresión de SMAD7, por lo que no se observa regulación negativa de SMAD2 y SMAD3 [128].

La figura 16 presenta el resultado de 200 simulaciones con ADIPOQ=0, LEPTIN=1, PDGF=1, TGFB=1 y TNF=1, estableciendo los valores de los vértices restantes en forma aleatoria. La red se dejó correr durante 15 pasos de tiempo, suficientes para alcanzar el atractor de activación parcial. En  $t = 15$ , el estado de SMAD7 se cambió a 0, y se mantuvo así durante otros 15 pasos en la simulación en los que la red alcanza el atractor de activación total. Podemos concluir que la acción de SMAD7 previene la aparición del estado de activación total en la red Booleana.

En la gráfica se muestra la **frecuencia de activación** de los vértices de salida que se define como:

$$F_i^t = \sum_{j=1}^N S_i^t(j)/N$$

donde  $F_i^t$  representa la frecuencia con la que el vértice  $i$  está activo en el tiempo  $t$ ,  $N$  es el número total de simulaciones y  $S_i^t(j) \in \{1, 0\}$  es el estado del vértice  $i$  en el tiempo  $t$  en la  $j$ -ésima simulación.

De forma análoga, la activación continua de SMAD7 inactiva a los vértices de salida: Atracción de Leucocitos, Contractilidad celular y Fibrogénesis; mientras que Expresión de alphaSMA y Proliferación continúan encendidos. Por lo tanto, en este modelo, SMAD7 no puede contrarrestar de forma individual a todas las señales que promueven el fenotipo activo en las HSCs.

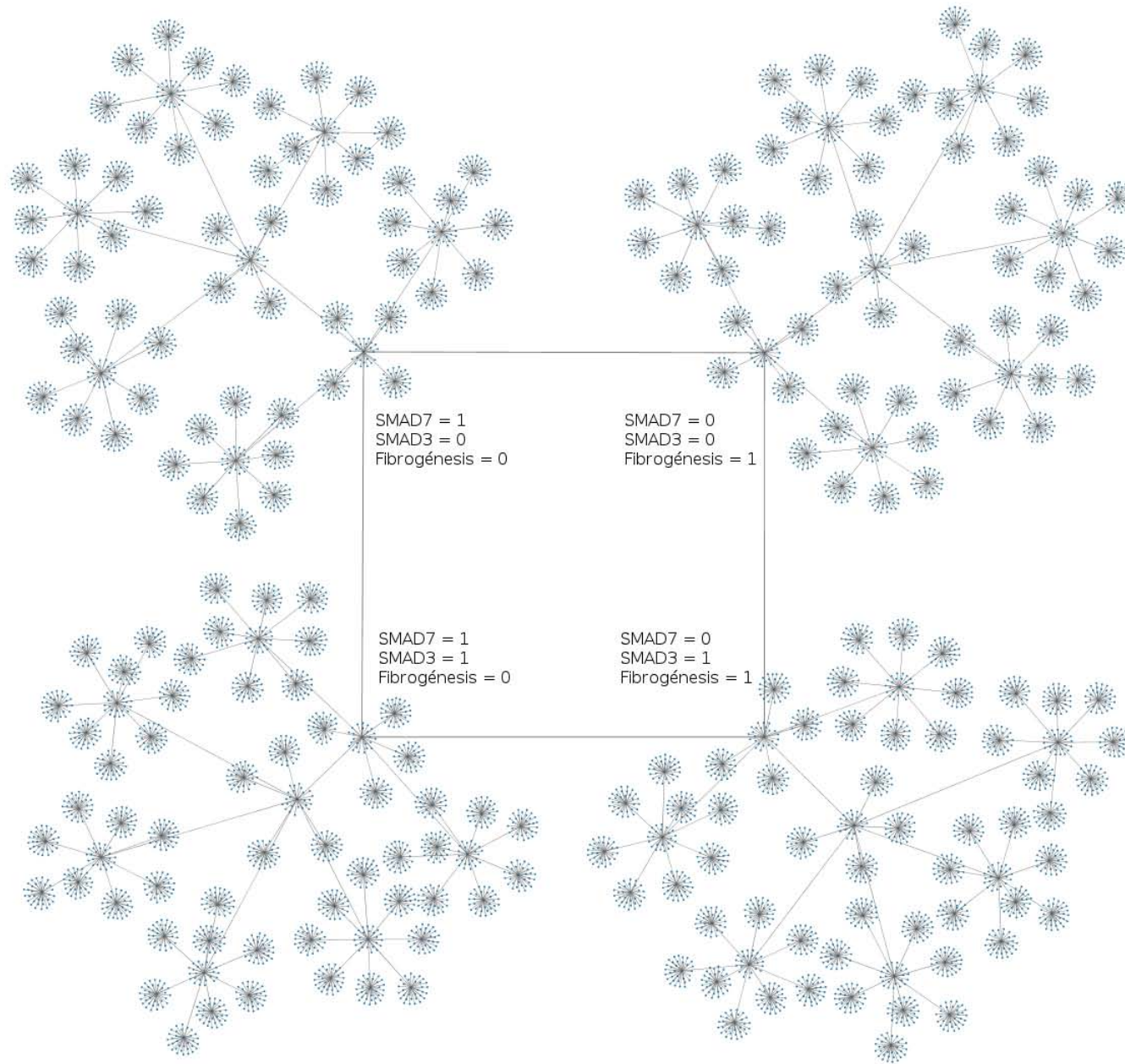


Figura 15: Fragmento de la cuenca de atracción del atractor alcanzado cuando los vértices de entrada toman los valores ADIPOQ=0, LEPTIN=1, PDGF=1, TGF $\beta$ =1 y TNF=1. La condición de entrada estabiliza los valores de 25 vértices dejando  $2^{13}$  condiciones iniciales restantes. Cada estado del sistema es un vértice en la gráfica y las aristas unen estados consecutivos en la ejecución de la red. El atractor resulta de la oscilación en los valores de SMAD7 y SMAD3, que ocasiona cambios en los valores de otros vértices, como el de Fibrogénesis.



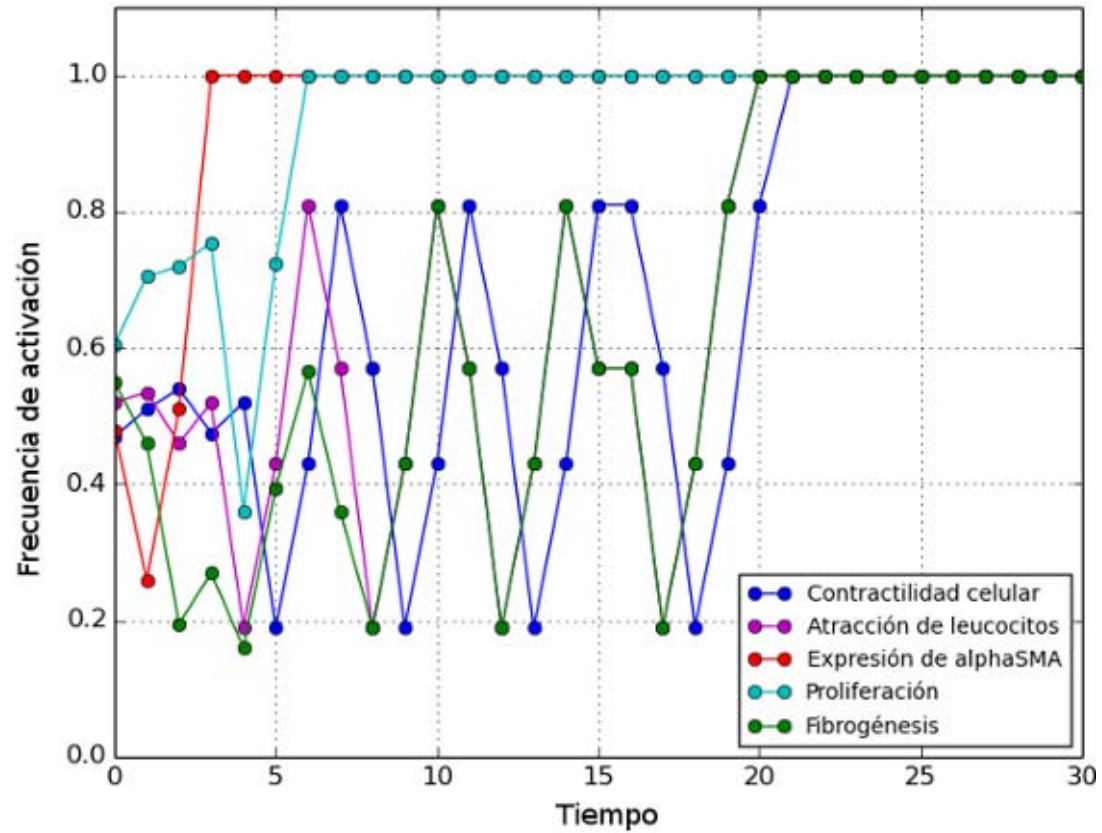


Figura 16: Simulación con  $ADIPOQ=0$ ,  $LEPTIN=1$ ,  $PDGF=1$ ,  $TGFB=1$  y  $TNF=1$  y valor aleatorio para los vértices restantes. Se muestra la frecuencia de activación en 200 simulaciones. En  $t = 8$  la red alcanza el atractor de activación parcial donde Expresión de alphaSMA y Proliferación tienen valor 1 y oscilan los valores de los demás vértices de salida. A partir de  $t = 15$ , SMAD7 se establece en cero y la red alcanza el atractor de activación total.

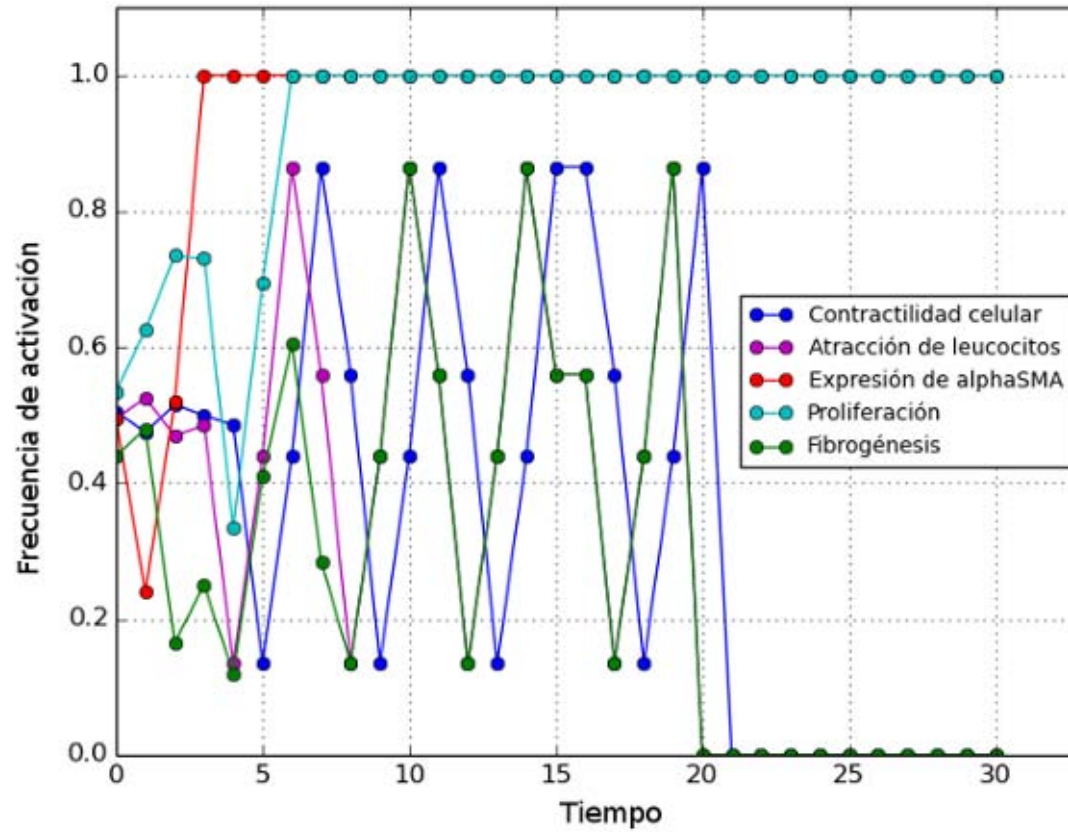


Figura 17: Simulación con  $ADIPOQ=0$ ,  $LEPTIN=1$ ,  $PDGF=1$ ,  $TGFB=1$  y  $TNF=1$  y valor aleatorio para los vértices restantes. Se muestra la frecuencia de activación en 200 simulaciones. La red alcanza el atractor de activación parcial en  $t = 8$ . A partir de  $t = 15$ , SMAD7 se establece en uno. Los valores de los nodos de salida que antes oscilaban se fijan en cero y el valor de alphaSMA y Proliferación continúa en 1.



Para conocer los valores de los demás vértices en la red cuando  $PPARG=1$  y  $SMAD7=0$  permanentemente, buscamos los atractores con las 32 combinaciones en los vértices de entrada. Los atractores resultaron ser tres conjuntos de puntos fijos que difieren en la activación de ADIPOR2, AMPK, JAK2 y LXRalpha. Se presentan en la figura 18, agrupando los valores de los vértices de entrada.

Con los resultados de las simulaciones anteriores podemos concluir que, en este modelo, la actividad de PPARG puede llevar a la célula estelar hepática, de un fenotipo activo, a un fenotipo quiescente. Este resultado es congruente con los datos experimentales obtenidos de las publicaciones consultadas, lo que nos permite afirmar que el modelo expresa de forma acertada las características más relevantes del proceso biológico en cuestión.

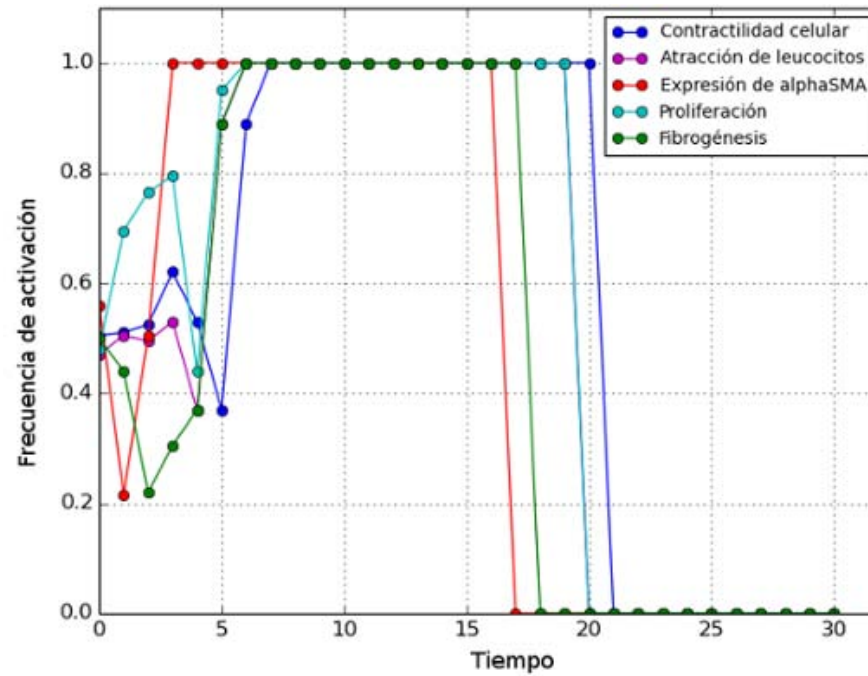


Figura 19: Simulación con  $ADIPOQ=0$ ,  $LEPTIN=1$ ,  $PDGF=1$ ,  $TGFB=1$ ,  $TNF=1$  y  $SMAD7=0$  permanentemente. Se muestra la frecuencia de activación en 200 simulaciones. En  $t = 7$  la red alcanza el atractor de activación total donde todos los vértices de salida se encuentran encendidos. A partir de  $t = 15$ ,  $PPARG=1$  y la red alcanza un nuevo atractor, el estado quiescente, en el que todos los vértices de salida tienen valor 0.

# Conclusión

---

La flexibilidad del formalismo lógico de modelación utilizado, las redes Booleanas, nos permitieron construir un modelo con los componentes biológicos principales y las interacciones entre proteínas e interacciones de regulación transcripcional más relevantes en el proceso de activación de las células estelares hepáticas (HSCs) y el papel de PPAR $\gamma$  en su reversión. La activación de las HSCs es uno de los cambios primordiales ocurridos durante la fibrosis hepática, ya que es altamente responsable de la acumulación progresiva de colágena y la falta de reestructuración en la matriz extracelular.

En el hígado dañado, el comportamiento de todos los tipos celulares se altera y se secretan citocinas que generan características muy particulares y conforman el fenotipo activo en las HSCs: proliferación, fibrogénesis, expresión de  $\alpha$ -SMA, un fenotipo contráctil y activación de la respuesta inmune. La actividad transcripcional del receptor nuclear PPAR $\gamma$  ha sido estudiada como mecanismo de reversión de la activación de las HSCs, es decir, como promotor del fenotipo quiescente en las células.

Para integrar dichos procesos y estudiar la dinámica del sistema que forman, se consultaron artículos en la literatura que reportaran observaciones experimentales sobre las interacciones involucradas. Con dicha información se construyó una gráfica dirigida que posteriormente fue traducida a una red Booleana y simplificada utilizando herramientas de software ya existentes.

La red tiene cinco vértices de entrada: ADIPOQ, LEPTIN, PDGF, TGF $\beta$  y TNF. El primer componente tiene efectos anti-fibrogénicos mientras que los demás generan señales que promueven la activación de las HSCs. Los valores de los vértices de salida: Proliferación, Expresión de alphaSMA, Atracción de leucocitos, Contractilidad celular y Fibrogénesis; permiten distinguir tres estados celulares: activación parcial, activación total y quiescencia.

La búsqueda de atractores reveló que la red Booleana construida no alcanza el estado de activación total, ni siquiera en las condiciones iniciales donde todos los vértices pro-activación de entrada están encendidos y ADIPOQ no tiene actividad. Al analizar el diagrama de estados del atractor, encontramos que la actividad del vértice asociado a Smad7 modula la transición del estado de activación parcial al estado de activación total. Smad7 es una proteína que participa como regulador negativo en la vía de señalización de TGF- $\beta$ , principal promotor del fenotipo activo en las HSCs. TGF- $\beta$  activa a Smad2 y Smad3, quienes promueven la expresión de Smad7 y éste es capaz de terminar con la señal uniéndose al receptor de TGF- $\beta$  [23, 128].

Existen estudios muy actuales que investigan los mecanismos particulares que dan lugar al *feedback* regulario TGF- $\beta$ -Smad7. Se ha encontrado que algunos microRNAs, secuencias pequeñas de RNA con actividad regulatoria, participan en el proceso. Por ejemplo, miR-17-5p contribuye a la proliferación y activación de las células estelares hepáticas inhibiendo a Smad7 [129], mientras que miR-30 promueve el fenotipo quiescente con un mecanismo inverso[120]; otro tipo de regulación, la metilación del ADN, mecanismo epigenético que inhibe la transcripción, está también asociado a la represión de Smad7 en el contexto de la fibrosis hepática [18].

También se estudia la actividad de Smad7 en diversas etiologías. Por ejemplo, se conoce

que en pacientes con hepatitis B los niveles de Smad7 se incrementan durante la resolución de la enfermedad, después de que han llevado un tratamiento antiviral efectivo [14]. En pacientes con hepatocarcinoma se encontró que altos niveles de Smad7 en el tumor y en el tejido que lo rodea pueden contrarrestar el crecimiento del tumor, mientras que niveles bajos de Smad7 están asociados a una mala prognosis [30]. Estos resultados han sugerido a Smad7 como blanco terapéutico y existen varios estudios en los que se prueban diversos compuestos que previenen la progresión de la fibrosis y cuyo mecanismo de acción es la activación de Smad7 [123, 126, 127]. Por lo tanto, los resultados del análisis dinámico en la red Booleana están de acuerdo con los mecanismos observados experimentalmente, pero se requieren más estudios para entender mejor el papel que juega Smad7 en la activación de las HSCs y su rol potencial como agente anti-fibrótico o como biomarcador en la enfermedad.

Por su parte, la modelación de la actividad de PPAR $\gamma$  forma el resultado principal de este trabajo ya que añade una caracterización formal, capaz de ser manipulada computacionalmente, a las importantes observaciones y conclusiones obtenidas mediante técnicas experimentales. PPAR $\gamma$  traslada a la red, de un atractor asociado al fenotipo activo impulsado por las señales pro-activación, hacia un fenotipo quiescente en el que los vértices de salida, que representan características biológicas típicas de las células estelares hepáticas activas, tienen todos valores de cero.

Experimentalmente se conoce, desde hace más de una década, que la activación de las células estelares conlleva una disminución en la expresión y actividad de PPAR $\gamma$ , mientras que el tratamiento con ligando de PPAR $\gamma$  revierte el fenotipo hacia uno quiescente [35, 48, 81]. Al igual que con Smad7, se siguen investigando los mecanismos específicos de las interacciones alrededor de PPAR $\gamma$ , con especial atención a los microRNAs. Por ejemplo, se conoce que miR-34a, miR-130a y miR-130b están relacionados con la inhibición de PPAR $\gamma$ , los dos últimos en un proceso en el que también participa TGF- $\beta$ [71, 74].

PPAR $\gamma$  es también probado como blanco terapéutico y se investiga su papel en los efectos promovidos por la curcumina, un antioxidante que suprime la activación de las HSCs *in vivo* e *in vitro* [55, 132]. Otros compuestos como el ergosterol [116] y la hormona relaxina [109] han sido también probados como promotores de PPAR $\gamma$  y otros componentes que promueven el estado quiescente en las células estelares.

Como desarrollo a futuro se pretende integrar al modelo datos experimentales provenientes de microarreglos de expresión que permitan conocer la actividad de los genes en, al menos, las dos condiciones principales en las células estelares hepáticas: el fenotipo activo y el fenotipo quiescente. También se buscará crecer el número de componentes e interacciones en la gráfica para integrar otros elementos que participan en la activación de las células estelares hepáticas y así representar el proceso biológico de forma más precisa. Con una red más grande sería interesante implementar una comparación entre diversos métodos de reducción de redes Booleanas para conocer la herramienta o metodología más adecuada para el modelo de este sistema biológico en particular.

Además, este modelo ayudará a nuestro equipo de trabajo a continuar con la investigación y el desarrollo de mecanismos que reviertan la activación de células estelares hepáticas y asistan en la restauración del hígado en condiciones de fibrosis. En particular, se trabaja en el desarrollo de una computadora molecular que, al detectar un estado de activación en las células estelares hepáticas, promueva la expresión de PPAR $\gamma$  y modifique el estado de las células a un estado quiescente. Este modelo aporta sugerencias sobre el conjunto de elementos que serían los blancos del sensor de la computadora molecular y sobre los mecanismos del conjunto de citocinas pro-fibrogénicas que inactivan a PPAR $\gamma$  en la célula estela hepática.

Los resultados presentados en este trabajo son una buena representación de la expresividad con que las redes Booleanas pueden capturar el comportamiento dinámico de un sistema biológico. Los atractores encontrados se asociaron a estados celulares, dándole un significado biológico al comportamiento a largo plazo de la red Booleana. Esto se logró conociendo solamente la naturaleza de las interacciones entre los componentes, sin requerir de parámetros cinéticos. Además, proponemos ahondar en la investigación del papel de Smad7 para que surjan nuevas hipótesis en el campo experimental que permitan conocer mejor los mecanismos involucrados en la fibrosis hepática.

Todo esto hace del presente trabajo un buen ejemplo de cómo la integración de diversas fuentes, la aplicación de formalismos de modelación y el uso de herramientas de software en el contexto de la biología de sistemas permiten abordar procesos celulares para entender mejor su comportamiento y proponen nuevos estudios para continuar con la investigación.



# Anexos

## 1. Vértices en la gráfica

Vértice	Símbolo Oficial	Nombre	Tipo
ADIPOQ	ADIPOQ	Adiponectin	Extracelular
ADIPOR2	ADIPOR2	Adiponectin receptor 2	Receptor
alphaSMA	ACTA2	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	Intracelular
AMPK	PRKA	Protein kinase, AMP-activated, alpha	Intracelular
AP1		Complejo JUND, FOS, C-JUN	Intracelular
Atracción de Leucocitos		Atracción de Leucocitos	Proceso
C-FOS	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Intracelular
C-JUN	JUN	Jun proto-oncogene	Intracelular
CA2		Calcium	Intracelular
CASPASE3	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	Intracelular
COL1A1	COL1A1	Collagen, type I, alpha 1	Extracelular
COL1A2	COL1A2	Collagen, type I, alpha 2	Extracelular
Contractilidad celular		Contractilidad celular	Proceso
CTGF	CTGF	Connective tissue growth factor	Extracelular
CTGFR	ITGA5B3	Integrin, alpha 5 beta 3.	Receptor
CTNNB1	CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1	Intracelular
ECE1	ECE1	Endothelin converting enzyme 1	Intracelular
EDNR	EDNRA, EDNRB	Endothelin receptor	Receptor
ELK1	ELK1	ELK1, member of ETS oncogene family	Intracelular
ERK1-2	MAPK3- MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 3/Mitogen-activated protein kinase 1	Intracelular
ERK5	MAPK7	Mitogen-activated protein kinase 7	Intracelular
ET1	EDN1	Endothelin 1	Extracelular
FAK	PTK2	Protein tyrosine kinase 2	Intracelular
Fibrogénesis		Fibrogénesis	Proceso
FN1	FN1	Fibronectin 1	Extracelular
FN1R	ITGA5B1- ITGAVB3	Integrin, alpha 5 beta 1. Integrin alpha V beta 3.	Receptor
ICAM1	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	Extracelular
IP3		Inositol 1,4,5-trisphosphate	Intracelular

Vértice	Símbolo Oficial	Nombre	Tipo
JAK2	JAK2	Janus kinase 2	Intracelular
JNK1	MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	Intracelular
JUND	JUND	Jun D proto-oncogene	Intracelular
LEPR	LEPR	Leptin receptor	Receptor
LEPTIN	LEP	Leptin	Extracelular
LXRalpha	LXRalpha	Liver X receptor alpha	Intracelular
MEF2C	MEF2C	Myocyte enhancer factor 2C	Intracelular
MEK1-2	MAP2K1- MAP2K2	Mitogen-activated protein kinase kinase 1/Mitogen-activated protein kinase kinase 2	Intracelular
MKK3-6	MAP2K3, MAP2K6	Mitogen-activated protein kinase kinase 3-6	Intracelular
MLC	MLC	Myosin light chain	Intracelular
MTOR	MTOR	Mechanistic target of rapamycin	Intracelular
NFKB	NFKB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells	Intracelular
p38MAPK	MAPK14, MAPK11, MAPK12, MAPK13	Mitogen-activated protein kinase 11, 12, 13, 14	Intracelular
PAI1	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	Extracelular
PDGF	PDGFB	Platelet-derived growth factor beta polypeptide	Extracelular
PDGFRB	PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	Receptor
PI3K-AKT	PIK3CA, PIK3CB/ AKT1	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha, beta - V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	Intracelular
PKC	PKC	Protein kinase C	Intracelular
PLC	PLC	Phospholipase C	Intracelular
PPARG	PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Intracelular
Proliferación		Proliferación	Proceso
RAF1	RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	Intracelular
RAS	NRAS, HRAS, KRAS	Ras oncogene family	Intracelular
RHOA	RHOA	Ras homolog family member A	Intracelular
SHC	SHC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase	Intracelular
SMAD2	SMAD2	SMAD family member 2	Intracelular
SMAD3	SMAD3	SMAD family member 3	Intracelular

Vértice	Símbolo Oficial	Nombre	Tipo
SMAD7	SMAD7	SMAD family member 7	Intracelular
SRC	SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase	Intracelular
SREBP1c	SREBP1c	Sterol regulatory element-binding protein 1	Intracelular
STAT3	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Intracelular
TGFB	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	Extracelular
TGFBR	TGFBR1, TGFBR2	Transforming growth factor, beta receptor 1, 2	Receptor
TIMP1	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	Extracelular
TNF	TNF	Tumor necrosis factor	Extracelular
TNFR	TNFRSF	Tumor necrosis factor receptor superfamily	Receptor
TRPM7	TRPM7	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7	Receptor
VCAM1	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	Extracelular
VEGF	VEGFA, VEGFB	Vascular endothelial growth factor A, vascular endothelial growth factor B	Extracelular

## 2. Interacciones en la gráfica extendida

Fuente	Interacción	Objetivo		Interacción Directa
PDGF	Activa	PDGFRB	[88]	Sí
PDGFRB	Activa	RAS	[88]	No
RAS	Activa	RAF1	[88]	Sí
RAF1	Activa	MEK1-2	[88]	Sí
MEK1-2	Activa	ERK1-2	[88]	Sí
ERK1-2	Activa	JUND	[110]	Sí
ERK1-2	Activa	ELK1	[88]	Sí
ELK1	Promueve	Proliferación	[88]	No
ERK1-2	Promueve expresión	C-FOS	[88, 36]	No
JUND	Activa	AP1	[77]	Sí
C-JUN	Activa	AP1	[77]	Sí
C-FOS	Activa	AP1	[77]	Sí
AP1	Promueve expresión	TIMP1	[77, 110]	Sí
TIMP1	Promueve	Proliferación	[77, 110]	No
TIMP1	Promueve	Fibrogénesis	[77, 110]	No
PDGFRB	Activa	FAK	[121]	Sí
FAK	Activa	PI3K-AKT	[121]	Sí
PI3K-AKT	Promueve	Proliferación	[121]	No
PI3K-AKT	Activa	MTOR	[135]	Sí
ERK1-2	Promueve expresión	VEGF	[135]	No
MTOR	Promueve expresión	VEGF	[135]	No

Fuente	Interacción	Objetivo		Interacción Directa
VEGF	Promueve	Proliferación	[135]	No
PDGFRB	Activa	ERK5	[94]	Sí
ERK5	Activa	MEF2C	[94]	Sí
MEF2C	Promueve expresión	C-JUN	[94]	Sí
PDGFRB	Promueve expresión	TRPM7	[28]	No
TRPM7	Promueve	Proliferación	[28]	No
TGFB	Activa	TGFBR	[68]	Sí
TGFBR	Activa	SMAD2	[68]	Sí
TGFBR	Activa	SMAD3	[68]	Sí
SMAD3	Promueve expresión	COL1A2	[54]	No
COL1A2	Promueve	Fibrogénesis	[54]	No
SMAD3	Promueve expresión	TIMP1	[137]	No
SMAD3	Promueve expresión	FN1	[54]	No
SMAD3	Promueve expresión	ET1	[70]	No
SMAD3	Promueve expresión	CTGF	[73]	No
SMAD3	Promueve expresión	SMAD7	[68, 23]	Sí
SMAD7	Inhibe actividad	SMAD2	[68, 23]	Sí
SMAD7	Inhibe actividad	SMAD3	[68, 23]	Sí
SMAD2	Promueve expresión	PAI1	[122]	No
SMAD3	Promueve expresión	PAI1	[122]	No
PAI1	Promueve	Fibrogénesis	[122]	No
SMAD2	Promueve expresión	COL1A1	[119]	No
SMAD3	Promueve expresión	COL1A1	[119]	No
COL1A1	Promueve	Fibrogénesis	[119]	No
SMAD2	Promueve expresión	TRPM7	[27]	No
SMAD3	Promueve expresión	TRPM7	[27]	No
TRPM7	Activa	SMAD2	[27]	No
TRPM7	Activa	SMAD3	[27]	No
TGFBR	Activa	MKK3-6	[119]	No
MKK3-6	Activa	p38MAPK	[119]	Sí
p38MAPK	Activa	SMAD3	[34, 119]	No
p38MAPK	Promueve expresión	COL1A1	[119]	No
p38MAPK	Promueve expresión	ECE1	[60, 106]	No
p38MAPK	Promueve expresión	alphaSMA	[119]	No
TGFBR	Activa	JNK1	[52]	No
JNK1	Promueve expresión	alphaSMA	[52]	No
TGFBR	Promueve expresión	CTNNB1	[89]	No
CTNNB1	Disminuye expresión	PPARG	[89]	No
CTGF	Activa	CTGFR	[37, 53]	No
CTGFR	Activa	ERK1-2	[36]	No
CTGFR	Promueve expresión	alphaSMA	[90]	No
CTGFR	Promueve expresión	COL1A1	[90]	No
CTGFR	Activa	NFKB	[38]	No
NFKB	Promueve	Proliferación	[38]	No
LEPTIN	Activa	LEPR	[100]	Sí
LEPR	Activa	JAK2	[100]	Sí

Fuente	Interacción	Objetivo		Interacción Directa
JAK2	Activa	STAT3	[100]	Sí
STAT3	Promueve expresión	COL1A2	[100]	No
JAK2	Promueve expresión	alphaSMA	[100]	No
JAK2	Activa	PI3K-AKT	[101]	No
PI3K-AKT	Disminuye expresión	PPARG	[143, 142]	No
STAT3	Promueve expresión	TIMP1	[45]	No
FN1	Activa	FN1R	[134]	Sí
FN1R	Activa	SRC	[134]	Sí
SRC	Activa	SHC	[134]	Sí
SHC	Activa	ERK1-2	[134]	Sí
ERK1-2	Promueve expresión	ET1	[134]	No
ET1	Activa	EDNR	[105]	Si
EDNR	Promueve expresión	ECE1	[105]	No
ECE1	Activa	ET1	[105]	Sí
EDNR	Activa	PLC	[59]	No
PLC	Promueve formación	IP3	[59]	No
IP3	Promueve liberación	CA2	[59]	No
CA2	Activa	MLC	[59]	No
MLC	Activa	Contractilidad celular	[59]	No
EDNR	Activa	PKC	[66]	No
PKC	Activa	RHOA	[66]	No
RHOA	Activa	MLC	[66]	No
TNF	Activa	TNFR	[99]	Sí
TNFR	Activa	NFKB	[99]	No
NFKB	Promueve expresión	VCAM1	[63]	No
VCAM1	Promueve	Atracción de Leucocitos	[63]	No
NFKB	Promueve expresión	ICAM1	[75, 50]	No
ICAM1	Promueve	Atracción de Leucocitos	[75, 50]	No
TNFR	Activa	ERK1-2	[115]	No
ERK1-2	Inhibe actividad	PPARG	[115, 35]	No
PPARG	Disminuye expresión	PDGFRB	[135]	No
PPARG	Inhibe actividad	JUND	[49]	Sí
PPARG	Disminuye expresión	COL1A1	[81]	No
PPARG	Disminuye expresión	alphaSMA	[81]	No
PPARG	Disminuye expresión	CTGF	[114]	No
PPARG	Disminuye expresión	PAI1	[140]	No
PPARG	Inhibe actividad	SMAD3	[140]	No
PPARG	Disminuye expresión	TGFBR	[141]	No
PPARG	Promueve expresión	LXRalpha	[107]	No
LXRalpha	Promueve expresión	SREBP1c	[107]	No
SREBP1c	Promueve expresión	PPARG	[107]	No
LEPR	Activa	p38MAPK	[125]	No

Fuente	Interacción	Objetivo		Interacción Directa
p38MAPK	Disminuye expresión	LXRalpha	[125]	No
STAT3	Disminuye expresión	LXRalpha	[139]	No
LEPR	Activa	CTNNB1	[133]	No
CTNNB1	Disminuye expresión	SREBP1c	[133]	No
ADIPOQ	Activa	ADIPOR2	[22]	No
ADIPOR2	Activa	AMPK	[22]	No
ADIPOR2	Activa	CASPASE3	[22]	No
CASPASE3	Inhibe	Proliferación	[22]	No
ADIPOR2	Inhibe actividad	JAK2	[45]	No
ADIPOR2	Inhibe actividad	TIMP1	[45]	No
AMPK	Inhibe actividad	PDGFRB	[72]	No
AMPK	Inhibe actividad	STAT3	[46]	No
AMPK	Inhibe actividad	SMAD2	[72]	No
AMPK	Inhibe actividad	SMAD3	[46]	No
AMPK	Inhibe actividad	PI3K-AKT	[6]	No
ADIPOR2	Promueve expresión	PPARG	[104]	No
ADIPOR2	Promueve expresión	SREBP1c	[104]	No

### 3. Interacciones para NET-SYNTHESIS

Las interacciones se presentan en el formato de entrada para NET-SYNTHESIS. La etiqueta **Y** marca a las interacciones críticas.

ADIPOQ → ADIPOR2	NFKB → VCAM1
ADIPOR2 † (LEPR → JAK2)	p38MAPK † LXRalpha
ADIPOR2 † (STAT3 → TIMP1)	p38MAPK → alphaSMA
ADIPOR2 → AMPK	p38MAPK → COL1A1
ADIPOR2 → CASPASE3	p38MAPK → ECE1
ADIPOR2 → PPARG Y	p38MAPK → SMAD3
ADIPOR2 → SREBP1c	PAI1 → Fibrogenesis
AMPK † (JAK2 → STAT3)	PDGF → PDGFRB Y
AMPK † PDGFRB Y	PDGFRB → ERK5 Y
AMPK † PI3K-AKT	PDGFRB → FAK Y
AMPK † SMAD2	PDGFRB → RAS Y
AMPK † SMAD3	PDGFRB → TRPM7 Y
AP1 → TIMP1	PI3K-AKT † PPARG Y
C-FOS → AP1	PI3K-AKT → MTOR
C-JUN → AP1	PI3K-AKT → Proliferacion
CA2 → MLC	PKC → RHOA
CASPASE3 † Proliferacion	PLC → IP3
COL1A1 → Fibrogenesis	PPARG † alphaSMA Y
COL1A2 → Fibrogenesis	PPARG † COL1A1 Y
CTGF → CTGFR Y	PPARG † JUND Y
CTGFR → (ERK1-2 → C-FOS)	PPARG † PDGFRB Y
CTGFR → (ERK1-2 → ELK1)	PPARG † SMAD3 Y
CTGFR → alphaSMA	PPARG † TGFBR Y

CTGFR → COL1A1	PPARG → LXRalpha Y
CTGFR → NFKB	RAF1 → MEK1-2
CTNNB1 † PPARG Y	RAS → RAF1
CTNNB1 † SREBP1c	RHOA → MLC
ECE1 → ET1	SHC → (ERK1-2 → ET1)
EDNR → ECE1 Y	SMAD2 → COL1A1
EDNR → PKC Y	SMAD2 → PAI1
EDNR → PLC Y	SMAD2 → TRPM7
ELK1 → Proliferacion	SMAD3 → COL1A1
ERK1-2 † PPARG Y	SMAD3 → COL1A2
ERK1-2 → C-FOS	SMAD3 → CTGF Y
ERK1-2 → ELK1	SMAD3 → ET1
ERK1-2 → ET1	SMAD3 → FN1
ERK1-2 → JUND	SMAD3 → PAI1
ERK1-2 → VEGF Y	SMAD3 → SMAD7
ERK5 → MEF2C	SMAD3 → TIMP1
ET1 → EDNR Y	SMAD3 → TRPM7
FAK → PI3K-AKT	SMAD7 † SMAD2
FN1 → FN1R	SMAD7 † SMAD3
FN1R → SRC	SRC → SHC
ICAM1 → Atraccion	SREBP1c → PPARG Y
IP3 → CA2	STAT3 † LXRalpha
JAK2 → (PI3K-AKT † PPARG)	STAT3 → COL1A2
JAK2 → alphaSMA	STAT3 → TIMP1
JAK2 → STAT3	TGFB → TGFBR Y
JNK1 → alphaSMA	TGFBR → (CTNNB1 † PPARG)
JUND → AP1	TGFBR → JNK1 Y
LEPR → (CTNNB1 † SREBP1c)	TGFBR → MKK3-6 Y
LEPR → (p38MAPK † LXRalpha)	TGFBR → SMAD2 Y
LEPR → JAK2 Y	TGFBR → SMAD3 Y
LEPTIN → LEPR Y	TIMP1 → Fibrogenesis
LXRalpha → SREBP1c	TIMP1 → Proliferacion
MEF2C → C-JUN	TNF → TNFR Y
MEK1-2 → (ERK1-2 → C-FOS)	TNFR → (ERK1-2 † PPARG)
MEK1-2 → (ERK1-2 → ELK1)	TNFR → (NFKB → ICAM1) Y
MEK1-2 → (ERK1-2 → JUND)	TNFR → (NFKB → VCAM1) Y
MKK3-6 → p38MAPK	TRPM7 → Proliferacion
MLC → Contraccion	TRPM7 → SMAD2
MTOR → VEGF Y	TRPM7 → SMAD3
NFKB → ICAM1	VCAM1 → Atraccion
NFKB → Proliferacion	VEGF → Proliferacion Y

#### 4. Reglas booleanas en la red reducida

ALPHASMA \*= TGFBR  $\wedge$   $\neg$ PPARG

ET1 \*= FN1

JAK2 \*= LEPTIN  $\wedge$   $\neg$ AMPK

LXRalpha \*= PPARG  $\wedge$   $\neg$ TGFBR  $\wedge$   $\neg$ JAK2  
 ATRACCION \*= NFKB  
 CONTRACTILIDAD \*= EDNR  
 EDNR \*= ET1  
 ADIPOR2 \*= ADIPOQ  
 FN1 \*= SMAD3  
 SMAD2 \*= TGFBR  $\vee$  TRPM7  
 SMAD7 \*= SMAD3  
 TGFBR \*= TGFBR  $\wedge$   $\neg$ PPARG  
 TRPM7 \*= SMAD2  $\vee$  PDGFRB  
 SMAD3 \*= (TGFBR  $\vee$  TRPM7)  $\wedge$   $\neg$ SMAD7  $\wedge$   $\neg$ PPARG  
 C-FOS \*= MEK1-2  $\vee$  CTGF  
 AP1 \*= (JUND  $\wedge$  C-FOS)  $\vee$  (C-JUN  $\wedge$  C-FOS)  
 C-JUN \*= PDGFRB  
 JUND \*= MEK1-2  $\wedge$   $\neg$ PPARG  
 PPARG \*= (ADIP2  $\vee$  LXRalpha)  $\wedge$   $\neg$ TGFBR  $\wedge$   $\neg$ TNF  $\wedge$   $\neg$ PI3K-AKT  
 AMPK \*= ADIPOR2  
 CTGF \*= SMAD3  
 MEK1-2 \*= PDGFRB  
 NFKB \*= CTGF  
 VEGF \*= PI3K-AKT  
 PROLIFERACION \*= (ELK1  $\wedge$  VEGF)  $\vee$  (ELK1  $\wedge$  TIMP1)  $\vee$  (ELK1  $\wedge$  NFKB)  $\vee$  (TIMP1  
 $\wedge$  VEGF)  $\vee$  (VEGF  $\wedge$  NFKB)  $\vee$  (TIMP1  $\wedge$  NFKB)  $\wedge$   $\neg$ ADIPOR2  
 ELK1 \*= MEK1-2  $\vee$  CTGF  
 PI3K-AKT \*= PDGFRB  
 PDGFRB \*= PDGF  $\wedge$   $\neg$ PPARG  $\wedge$   $\neg$ AMPK  
 COL1A1 \*= CTGF  $\wedge$   $\neg$ PPARG  
 PAI1 \*= SMAD3  
 COL1A2 \*= SMAD3  
 FIBROGENESIS \*= COL1A1  $\wedge$  (COL1A2  $\vee$  TIMP1  $\vee$  PAI1)  
 TIMP1 \*= AP1



## Referencias

- [1] genysis toolbox. <http://www.vital-it.ch/software/genYsis>.
- [2] Ncbi gene. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.
- [3] Kegg, kyoto encyclopedia of genes and genomes. <http://www.genome.jp/kegg/>, 1995.
- [4] String. <http://string-db.org>, 2000.
- [5] Wikipathways. pathways for the people. <http://www.wikipathways.org>, 2008.
- [6] Masayuki Adachi and David A Brenner. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 47(2):677–85, 2008.
- [7] István Albert, Juilee Thakar, Song Li, Ranran Zhang, and Réka Albert. Boolean network simulations for life scientists. *Source code for biology and medicine*, 3:16, 2008.
- [8] Réka Albert. Scale-free networks in cell biology. *Journal of cell science*, 118(Pt 21):4947–57, nov 2005.
- [9] Réka Albert, Bhaskar DasGubta, Riccardo Dondi, Sema Kachalo, Eduardo Sontag, Alexander Zelikovsky, and Kelly Westbrooks. A Novel Method for Signal Transduction Network Inference from Indirect Experimental Evidence. *J Comput Biol*, 14(7):927–949, 2007.
- [10] Réka Albert, Bhaskar DasGupta, Riccardo Dondi, and Eduardo Sontag. Inferring (biological) signal transduction networks via transitive reductions of directed graphs. *Algorithmica (New York)*, 51(2):129–159, 2008.
- [11] Réka Albert and Hans G. Othmer. The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the segment polarity genes in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Theoretical Biology*, 223(1):1–18, 2003.
- [12] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 6th edition, 2015.
- [13] Uri Alon. Network motifs: theory and experimental approaches. *Nature Reviews Genetics*, 8:450–461, 2007.
- [14] Nikoletta Argentou, Georgios Germanidis, Prodromos Hytiroglou, Eirini Apostolou, Themistoklis Vassiliadis, Kalliopi Patsiaoura, Paschalis Sideras, Anastasios E. Germeis, and Matthaïos Speletas. TGF- $\beta$  signaling is activated in patients with chronic HBV infection and repressed by SMAD7 overexpression after successful antiviral treatment. *Inflammation Research*, 65(5):355–365, 2016.
- [15] M J Arthur. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 279(2):G245–G249, 2000.

- [16] Ezio Bartocci and Pietro Lió. Computational Modeling, Formal Analysis, and Tools for Systems Biology. *PLOS Computational Biology*, 12(1):e1004591, 2016.
- [17] Ramón Bataller and David a Brenner. Liver fibrosis, 2005.
- [18] Er Bao Bian, Cheng Huang, Hua Wang, Xiao Xia Chen, Lei Zhang, Xiong Wen Lv, and Jun Li. Repression of Smad7 mediated by DNMT1 determines hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats. *Toxicology Letters*, 224(2):175–185, 2014.
- [19] James C. Bonner. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 15(4):255–273, 2004.
- [20] Bryant. Graph-Based Algorithms for Boolean Function Manipulation. *IEEE Transactions on Computers*, C-35(8):677–691, aug 1986.
- [21] H de Jong. Modeling and simulation of genetic regulatory systems: a literature review. *J Comput Biol*, 9(1):67–103, 2002.
- [22] Xiaokun Ding, Neeraj K Saxena, Songbai Lin, Aimin Xu, Shanthi Srinivasan, and Frank a Anania. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *The American journal of pathology*, 166(6):1655–1669, 2005.
- [23] Steven Dooley, Jafar Hamzavi, Katja Breitkopf, Eliza Wiercinska, Harun M Said, Johann Lorenzen, Peter ten Dijke, and Axel M Gressner. Smad7 prevents activation of Hepatic Stellate Cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology*, 125:178–191, 2003.
- [24] Steven Dooley and Peter ten Dijke. TGF- $\beta$  in progression of liver disease. *Cell Tissue Res.*, 347:245–256, 2012.
- [25] Gülsüm Özlem Elpek. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World journal of gastroenterology : WJG*, 20(23):7260–7276, 2014.
- [26] Jesús Espinal, Maximino Aldana, Adán Guerrero, Christopher Wood, Alberto Darszon, and Gustavo Martínez-Mekler. Discrete dynamics model for the speract-activated Ca<sup>2+</sup> signaling network relevant to sperm motility. *PLoS ONE*, 6(8):1–11, 2011.
- [27] Ling Fang, Cheng Huang, Xiaoming Meng, Baoming Wu, Taotao Ma, Xuejiao Liu, Qian Zhu, Shuxiang Zhan, and Jun Li. TGF- $\beta$ 1-elevated TRPM7 channel regulates collagen expression in Hepatic Stellate Cells via TGF- $\beta$ 1/Smad pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280:335–344, 2014.
- [28] Ling Fang, Shuxiang Zhan, Cheng Huang, Xi Cheng, Xiongwen Lv, Hongfang Si, and Jun Li. TRPM7 channel regulates PDGF-BB-induced proliferation of Hepatic Stellate Cells via PI3K and ERK pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272:713–725, 2013.
- [29] Blanca Farfan, Gabriela Mercado, Ricardo Strausz, Victor Hernandez-Urbina, and David Kershenovich. Applying dna computing to diagnose-and-interfere hepatic fibrosis. In *Natural Computation (ICNC), 2010 Sixth International Conference on*, volume 7, pages 3839–3841. IEEE, 2010.

- [30] Teng Feng, Johanna Dzieran, Xing Gu, Silke Marhenke, Arndt Vogel, Keigo Machida, Thomas S. Weiss, Petra Ruelle, Otto Kollmar, Patrick Hoffmann, Friedrich Grässer, Heike Allgayer, Jasmin Fabian, Hong Lei Weng, Andreas Teufel, Thorsten Maass, Christoph Meyer, Ulrich Lehmann, Cheng Zhu, Peter R. Mertens, Chun Fang Gao, Steven Dooley, and Nadja M. MeindlBeinker. Smad7 regulates compensatory hepatocyte proliferation in damaged mouse liver and positively relates to better clinical outcome in human hepatocellular carcinoma. *Clinical Science*, 128(11):761–774, 2015.
- [31] S L Friedman. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *The Journal of biological chemistry*, 275(4):2247–2250, 2000.
- [32] Scott L Friedman. Liver fibrosis – from bench to bedside. *Journal of hepatology*, 38 Suppl 1(15):S38–S53, 2003.
- [33] Scott L. Friedman. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol. Rev.*, 88:125–172, 2008.
- [34] Fukiko Furukawa, Koichi Matsuzaki, Shigeo Mori, Yoshiya Tahashi, Katsunori Yoshida, and Yasushi Sugano. p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. *Hepatology*, 38:879–889, 2003.
- [35] a Galli, D Crabb, D Price, E Ceni, R Salzano, C Surrenti, and a Casini. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional regulation is involved in platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 31(1):101–108, 2000.
- [36] Runping Gao, DeAnna K. Ball, Bernard Perbal, and David R. Brigstock. Connective tissue growth factor induces c-fos gene activation and cell proliferation through p44/42 MAP kinase in primary rat hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology*, 40(3):431–438, 2004.
- [37] Runping Gao and David R. Brigstock. Connective Tissue Growth Factor (CCN2) Induces Adhesion of Rat Activated Hepatic Stellate Cells by Binding of Its C-terminal Domain to Integrin  $\alpha v \beta 3$  and Heparan Sulfate Proteoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10):8848–8855, 2004.
- [38] Runping Gao and David R Brigstock. Activation of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) by connective tissue growth factor (CCN2) is involved in sustaining the survival of primary rat hepatic stellate cells. *Cell communication and signaling : CCS*, 3:14, 2005.
- [39] Abhishek Garg, Ioannis Xenarios, Luis Mendoza, and Giovanni Demicheli. An Efficient Method for Dynamic Analysis of Gene Regulatory Networks and in silico Gene Perturbation Experiments. *Lnbi*, 4453:62–76, 2007.
- [40] Axel M Gressner, Ralf Weiskirchen, Katja Breitkopf, and Steven Dooley. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 7(6):d793–d807, 2002.
- [41] Chuan-Yong Guo, Jian-Ye Wu, Yun-Bin Wu, Min-Zhang Zhong, and Han-Ming Lu. Effects of endothelin-1 on hepatic stellate cell proliferation, collagen synthesis and

- secretion, intracellular free calcium concentration. *World journal of gastroenterology*, 10(18):2697–2700, 2004.
- [42] Yp Han. Matrix Metalloproteinases, the Pros and Cons, in the Liver Fibrosis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 21(Suppl 3), 2006.
- [43] Yuan Ping Han, Chunli Yan, Ling Zhou, Lan Qin, and Hidekazu Tsukamoto. A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry*, 282(17):12928–12939, 2007.
- [44] Yuan Ping Han, Ling Zhou, Jiaohong Wang, Shigang Xiong, Warren L. Garner, Samuel W. French, and Hidekazu Tsukamoto. Essential Role of Matrix Metalloproteinases in Interleukin-1-induced Myofibroblastic Activation of Hepatic Stellate Cell in Collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6):4820–4828, 2004.
- [45] J Handy, P Ping, P Kuma, J Mells, S Sharma, N Saxena, and F Anania. Adiponectin inhibits leptin signaling via multiple mechanisms to exert protective effects against hepatic fibrosis. *Biochemical Journal*, 440(3):385–395, 2011.
- [46] Jeffrey a Handy, Neeraj K Saxena, Pingping Fu, Songbai Lin, Jamie E Mells, Niti-ka a Gupta, and Frank a Anania. Adiponectin activation of AMPK disrupts leptin-mediated hepatic fibrosis via Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS-3). *Journal of Cellular Biochemistry*, 110(5):1195–1207, 2010.
- [47] Inman Harvey and Terry Bossomaier. Time out of joint: Attractors in asynchronous random boolean networks. *Proceedings of the Fourth European Conference on Artificial Life*, pages 67–75, 1997.
- [48] Saswati Hazra, Takeo Miyahara, Richard a Rippe, and Hidekazu Tsukamoto. PPAR Gamma and Hepatic Stellate Cells. *Comparative hepatology*, 3(Suppl 1):S7, 2004.
- [49] Saswati Hazra, Shigang Xiong, Jiaohong Wang, Richard a. Rippe, V. Krishna K Chatterjee, and Hidekazu Tsukamoto. Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Induces a Phenotypic Switch from Activated to Quiescent Hepatic Stellate Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12):11392–11401, 2004.
- [50] Hellerbrand, S C Wang, H Tsukamoto, D a Brenner, and R a Rippe. Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 24(3):670–676, 1996.
- [51] V Hernandez-Gea and S L Friedman. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol*, 92(2):103–112, 2011.
- [52] Il Hwa Hong, Sang Joon Park, Moon Jung Goo, Hye Rim Lee, Jin Kyu Park, Mi Ran Ki, Sang Hyeob Kim, Eun Mi Lee, Ah Young Kim, and Kyu Shik Jeong. JNK1 and JNK2 regulate  $\alpha$ -SMA in hepatic stellate cells during CCl<sub>4</sub>-induced fibrosis in the rat liver. *Pathology International*, 63(10):483–491, 2013.
- [53] G Huang and D R Brigstock. Regulation of hepatic stellate cells by connective tissue growth factor. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 17:2495–2507, 2012.

- [54] Y Inagaki and I Okazaki. Emerging insights into Transforming Growth Factor  $\beta$  and Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut*, 56:284–292, 2007.
- [55] H Jin, N Lian, F Zhang, L Chen, Q Chen, C Lu, M Bian, J Shao, L Wu, and S Zheng. Activation of PPAR $\gamma$ /P53 signaling is required for curcumin to induce hepatic stellate cell senescence. *Cell death & disease*, 7:e2189, 2016.
- [56] Sema Kachalo, Ranran Zhang, Eduardo Sontag, Réka Albert, and Bhaskar DasGupta. NET-SYNTHESIS: A software for synthesis, inference and simplification of signal transduction networks. *Bioinformatics*, 24(2):293–295, 2008.
- [57] Guy Karlebach and Ron Shamir. Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(10):770–780, 2008.
- [58] S A Kauffman. Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *Journal of theoretical biology*, 22(3):437–67, mar 1969.
- [59] Al Karim Khimji and Don C. Rockey. Endothelin and hepatic wound healing, 2011.
- [60] Al-Karim Khimji, Rong Shao, and Don C Rockey. Divergent transforming growth factor-beta signaling in hepatic stellate cells after liver injury: functional effects on ECE-1 regulation. *The American journal of pathology*, 173(3):716–727, 2008.
- [61] Tatiana Kisseleva and David a. Brenner. Inactivation of myofibroblasts during regression of liver fibrosis. *Cell Cycle*, 12(3):381–382, 2013.
- [62] H. Kitano. Systems Biology: A Brief Overview. *Science*, 295(5560):1662–1664, 2002.
- [63] T Knittel, C Dinter, D Kobold, K Neubauer, M Mehde, S Eichhorst, and G Ramadori. Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair. *The American journal of pathology*, 154(1):153–167, 1999.
- [64] Thomas Knittel, Mirko Mehde, Dominik Kobold, Bernhard Saile, Christina Dinter, and Giuliano Ramadori. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: Regulation by TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1. *Journal of Hepatology*, 30(1):48–60, 1999.
- [65] Lakshmi Kuttippurathu, Austin Parrish, and Rajanikanth Vadigepalli. Integrated Computational Model of Intracellular Signaling and microRNA Regulation Predicts the Network Balances and Timing Constraints Critical to the Hepatic Stellate Cell Activation Process. *Processes*, 2(4):773–794, 2014.
- [66] Wim Laleman, Lien Van Landeghem, Tamara Severi, Ingrid Vander Elst, Marcel Zeegers, Raf Bisschops, Jos Van Pelt, Tania Roskams, David Cassiman, Johan Fevery, and Frederik Nevens. Both Ca<sup>2+</sup> -dependent and -independent pathways are involved in rat hepatic stellate cell contraction and intrahepatic hyperresponsiveness to methoxamine. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 292(2):G556–G564, 2007.
- [67] Nicolas Le Novère. Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks. *Nature reviews. Genetics*, 16(3):146–58, 2015.

- [68] Andrew Leask and David J Abraham. TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response. *FASEB J*, 18:816–827, 2004.
- [69] Carmen G Lechuga, Zamira H Hernández-Nazara, José-Alfredo Domínguez Rosales, Elena R Morris, Ana Rosa Rincón, Ana María Rivas-Estilla, Andrés Esteban-Gamboa, and Marcos Rojkind. TGF-beta1 modulates matrix metalloproteinase-13 expression in hepatic stellate cells by complex mechanisms involving p38MAPK, PI3-kinase, AKT, and p70S6k. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 287(5):G974–G987, 2004.
- [70] T. Li, Z. Shi, and D. C. Rockey. Preproendothelin-1 expression is negatively regulated by IFN during hepatic stellate cell activation. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(9):G948–G957, 2012.
- [71] Xiaofei Li, Yongxin Chen, Shuang Wu, Jinke He, Lianqing Lou, Weiwei Ye, and Jinhe Wang. microRNA-34a and microRNA-34c promote the activation of human hepatic stellate cells by targeting peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Molecular medicine reports*, 11(2):1017–24, feb 2015.
- [72] Joong Yeon Lim, Min a. Oh, Won Ho Kim, Hee Young Sohn, and Sang Ick Park. AMP-activated protein kinase inhibits TGF- $\beta$ -induced fibrogenic responses of hepatic stellate cells by targeting transcriptional coactivator p300. *Journal of Cellular Physiology*, 227(3):1081–1089, 2012.
- [73] Yan Liu, Heng Liu, Christoph Meyer, Jun Li, Silvio Nadalin, Alfred Königsrainer, Honglei Weng, Steven Dooley, and Peter ten Dijke. Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-mediated Connective Tissue Growth Factor (CTGF) expression in Hepatic Stellate Cells requires Stat3 signaling activation. *J. Biol. Chem.*, 288:30708–30719, 2013.
- [74] Le Lu, Jinlong Wang, Hongwei Lu, Guoyu Zhang, Yang Liu, Jiazhong Wang, Yafei Zhang, Hao Shang, Hong Ji, Xi Chen, Yanxia Duan, and Yiming Li. MicroRNA-130a and -130b enhance activation of hepatic stellate cells by suppressing PPAR $\gamma$  expression: A rat fibrosis model study. *Biochemical and biophysical research communications*, 465(3):387–93, sep 2015.
- [75] Tom Luedde and Robert F Schwabe. NF- $\kappa$ B in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8(2):108–118, February 2011.
- [76] Avi Ma'ayan, Andrew D. Rouillard, Neil R. Clark, Zichen Wang, Qiaonan Duan, and Yan Kou. Lean Big Data integration in systems biology and systems pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(9):450–460, 2014.
- [77] D a Mann and D E Smart. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut*, 50(6):891–896, 2002.
- [78] E Marcotte and S Date. Exploiting big biology: integrating large-scale biological data for function inference. *Briefings in bioinformatics*, 2(4):363–374, 2001.
- [79] L Mendoza, D Thieffry, and E R Alvarez-Buylla. Genetic control of flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*: a logical analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 15(7-8):593–606, 1999.

- [80] Cheng-gui Miao, Ying-ying Yang, Xu He, Cheng Huang, Yan Huang, Lei Zhang, Xiong-Wen Lv, Yong Jin, and Jun Li. Wnt signaling in liver fibrosis: progress, challenges and potential directions. *Biochimie*, 95(12):2326–35, 2013.
- [81] T. Miyahara, L. Schrum, R. Rippe, S. Xiong, Jr Yee H.F., K. Motomura, F. a. Anania, T. M. Willson, and H. Tsukamoto. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46):35715–35722, 2000.
- [82] Melody K Morris, Julio Saez-Rodriguez, Peter K Sorger, and Douglas A Lauffenburger. Logic-based models for the analysis of cell signaling networks. *Biochemistry*, 49(15):3216–24, apr 2010.
- [83] Frank R. Murphy, Razao Issa, Xiaoying Zhou, Shabna Ratnarajah, Hideaki Nagase, M. J P Arthur, Christopher Benyon, and John P. Iredale. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition. Implications for reversibility of liver fibrosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(13):11069–11076, 2002.
- [84] Natalia Nieto. A systems biology approach for understanding the collagen regulatory network in alcoholic liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 32(2):189–98, 2012.
- [85] Erica Novo, Stefania Cannito, Claudia Paternostro, Claudia Bocca, Antonella Miglietta, and Maurizio Parola. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 548:20–37, 2014.
- [86] Kevin Oishi and Eric Klavins. Framework for Engineering Finite State Machines in Gene Regulatory Networks. *ACS Synthetic Biology*, page 140305104422008, 2014.
- [87] Valerie Paradis, Delphine Dargere, Franck Bonvoust, Michel Vidaud, Patricia Segarini, and Pierre Bedossa. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 82(6):767–774, 2002.
- [88] Mazzimo Pinzani. PDGF and signal transduction in Hepatic Stellate Cells. *Frontiers in bioscience*, 7, 2002.
- [89] Jingjing Qian, Minghui Niu, Xuguang Zhai, Qian Zhou, and Yajun Zhou.  $\beta$ -Catenin pathway is required for TGF- $\beta$ 1 inhibition of PPAR $\gamma$  expression in cultured hepatic stellate cells. *Pharmacological Research*, 66(3):219–225, 2012.
- [90] A. Rachfal and D. Brigstock. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatology Research*, 26(1):1–9, 2003.
- [91] H Reynaert, M G Thompson, T Thomas, and a Geerts. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut*, 50(4):571–581, 2002.
- [92] D Rockey. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 25(1):2–5, 1997.

- [93] Don C. Rockey, Laura Fouassier, John J. Chung, Alain Carayon, Patrick Vallee, Colette Rey, and Chantal Housset. Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: Potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells. *Hepatology*, 27(2):472–480, 1998.
- [94] Elisabetta Rovida, Nadia Navari, Alessandra Caligiuri, Persio Dello Sbarba, and Fabio Marra. ERK5 differentially regulates PDGF-induced proliferation and migration of hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology*, 48:107–115, 2008.
- [95] a Ryll, J Bucher, a Bonin, S Bongard, E Gonçalves, J Saez-Rodriguez, J Niklas, and S Klamt. A model integration approach linking signalling and gene-regulatory logic with kinetic metabolic models. *Bio Systems*, 2014.
- [96] Assieh Saadatpour, István Albert, and Réka Albert. Attractor analysis of asynchronous Boolean models of signal transduction networks. *Journal of Theoretical Biology*, 266(4):641–656, 2010.
- [97] Assieh Saadatpour, Rui-Sheng Wang, Aijun Liao, Xin Liu, Thomas P. Loughran, István Albert, and Réka Albert. Dynamical and Structural Analysis of a T Cell Survival Network Identifies Novel Candidate Therapeutic Targets for Large Granular Lymphocyte Leukemia. *PLoS Computational Biology*, 7(11):e1002267, 2011.
- [98] B Saile, N Matthes, T Knittel, and G Ramadori. Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 30(1):196–202, 1999.
- [99] Bernhard Saile, Nina Matthes, H El Armouche, Katrin Neubauer, and Giuliano Ramadori. The bcl, NF $\kappa$ B and p53/p21<sup>WAF1</sup> systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF-*beta* or TNF-*alpha* on activated hepatic stellate cells. *European journal of cell biology*, 80(8):554–561, 2001.
- [100] Neeraj K. Saxena, Kazuo Ikeda, Don C. Rockey, Scott L. Friedman, and Frank a. Anania. Leptin in hepatic fibrosis: Evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology*, 35(4):762–771, 2002.
- [101] Neeraj K Saxena, Mark a Titus, Xiaokun Ding, Jeffrey Floyd, Shanthi Srinivasan, Shanthi V Sitaraman, and Frank a Anania. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(13):1612–1614, 2004.
- [102] Benjamin Schaefer, Ana María Rivas-Estilla, Noemí Meraz-Cruz, Miguel Arturo Reyes-Romero, Zamira H Hernández-Nazara, José-Alfredo Domínguez-Rosales, Detlef Schuppan, Patricia Greenwel, and Marcos Rojkind. Reciprocal modulation of matrix metalloproteinase-13 and type I collagen genes in rat hepatic stellate cells. *The American journal of pathology*, 162(6):1771–1780, 2003.
- [103] Ekihiro Seki and Robert F. Schwabe. Hepatic Inflammation and Fibrosis: Functional Links and Key Pathways. *Hepatology*, 2014.



- [104] Mahnoush S Shafiei, Shoba Shetty, Philipp E Scherer, and Don C Rockey. Adiponectin regulation of stellate cell activation via PPAR $\gamma$ -dependent and -independent mechanisms. *The American journal of pathology*, 178(6):2690–2699, 2011.
- [105] Rong Shao and Don C. Rockey. Effects of endothelins on hepatic stellate cell synthesis of endothelin-1 during hepatic wound healing. *Journal of Cellular Physiology*, 191(3):342–350, 2002.
- [106] Rong Shao, Zengdun Shi, Philip J Gotwals, Victor E Koteliansky, Jacob George, and Don C Rockey. Cell and molecular regulation of endothelin-1 production during hepatic wound healing. *Molecular biology of the cell*, 14(6):2327–2341, 2003.
- [107] Hongyun She, Shigang Xiong, Saswati Hazra, and Hidekazu Tsukamoto. Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *The Journal of biological chemistry*, 280(6):4959–4967, 2005.
- [108] Ilya Shmulevich, Edward R Dougherty, Seungchan Kim, and Wei Zhang. Probabilistic Boolean Networks: a rule-based uncertainty model for gene regulatory networks. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 18(2):261–74, feb 2002.
- [109] Sudhir Singh, Ronda L Simpson, and Robert G Bennett. Relaxin activates peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) through a pathway involving PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ). *The Journal of biological chemistry*, 290(2):950–9, jan 2015.
- [110] David E. Smart, Karen Green, Fiona Oakley, Jonathan B. Weitzman, Moshe Yaniv, Gary Reynolds, Jelena Mann, Harry Millward-Sadler, and Derek a. Mann. JunD is a profibrogenic transcription factor regulated by Jun N-terminal kinase-independent phosphorylation. *Hepatology*, 44:1432–1440, 2006.
- [111] David E. Smart, Karen J. Vincent, Michael J P Arthur, Oliver Eickelberg, Marc Castellazzi, Jelena Mann, and Derek a. Mann. JunD Regulates Transcription of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 and Interleukin-6 Genes in Activated Hepatic Stellate Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276:24414–24421, 2001.
- [112] Russell K. Soon and Hal F. Yee. Stellate Cell Contraction: Role, Regulation, and Potential Therapeutic Target, 2008.
- [113] S. N. Steinway, J. G. T. Zanudo, W. Ding, C. B. Rountree, D. J. Feith, T. P. Loughran, and R. Albert. Network Modeling of TGF Signaling in Hepatocellular Carcinoma Epithelial-to-Mesenchymal Transition Reveals Joint Sonic Hedgehog and Wnt Pathway Activation. *Cancer Research*, 74(21):5963–5977, 2014.
- [114] Kai Sun, Qian Wang, and Xiao-Hui Huang. PPAR gamma inhibits growth of rat hepatic stellate cells and TGF beta-induced connective tissue growth factor expression. *Acta pharmacologica Sinica*, 27(6):715–723, 2006.
- [115] Chin K Sung, Hongyun She, Shigang Xiong, and Hidekazu Tsukamoto. Tumor necrosis factor-alpha inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity at a posttranslational level in hepatic stellate cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 286(5):G722–G729, 2004.

- [116] Chen-Jei Tai, Chen-Yen Choong, Yu-Chun Lin, Yeu-Ching Shi, and Cheng-Jeng Tai. The anti-hepatic fibrosis activity of ergosterol depended on upregulation of PPAR-gamma in HSC-T6 cells. *Food & function*, 7(4):1915–23, apr 2016.
- [117] Terumi Takahara, Li Ping Zhang, Yutaka Yata, Feng Xue, Masami Minemura, Hiroshi Sato, and Akiharu Watanabe. Modulation of matrix metalloproteinase-9 in hepatic stellate cells by three-dimensional type I collagen: Its activation and signaling pathway. *Hepatology Research*, 26(4):318–326, 2003.
- [118] Christian Trautwein, Scott L. Friedman, Detlef Schuppan, and Massimo Pinzani. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *Journal of Hepatology*, 62(1):S15–S24, 2015.
- [119] Shigeki Tsukada, John K. Westwick, Kenichi Ikejima, Nobuhiro Sato, and Richard A. Rippe. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate  $\alpha 1(I)$  Collagen gene expression in unstimulated and Transforming Growth Factor- $\beta$ -stimulated Hepatic Stellate Cells. *J. Biol. Chem.*, 280:10055–10064, 2005.
- [120] Xiaolong Tu, Xiuxiu Zheng, Huanan Li, Zhipeng Cao, Hanwen Chang, Shaoyuan Luan, Jie Zhu, Jiangning Chen, Yuhui Zang, and Junfeng Zhang. MicroRNA-30 Protects Against Carbon Tetrachloride-induced Liver Fibrosis by Attenuating Transforming Growth Factor Beta Signaling in Hepatic Stellate Cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 146(1):157–69, jul 2015.
- [121] Yan Wang, Xiao-Yu Jiang, Li Liu, and Hui-Qing Jiang. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates hepatic stellate cell apoptosis. *World J. Gastroenterol.*, 14:5186–5191, 2008.
- [122] Rebecca G. Wells. Fibrogenesis. V. TGF- $\beta$  signaling pathways. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 279:G845–G850, 2000.
- [123] Fu-rong Wu, Ling Jiang, Xiao-li He, Peng-li Zhu, and Jun Li. Effect of hesperidin on TGF-beta1/Smad signaling pathway in HSC. *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica*, 40(13):2639–43, jul 2015.
- [124] Yufei Xiao. A tutorial on analysis and simulation of boolean gene regulatory network models. *Current genomics*, 10(7):511–525, 2009.
- [125] Kunfeng Yan, Xiong Deng, Xuguang Zhai, Mingming Zhou, Xin Jia, Lin Luo, Minghui Niu, Huixia Zhu, Hui Qiang, and Yajun Zhou. p38 mitogen-activated protein kinase and liver X receptor- $\alpha$  mediate the leptin effect on sterol regulatory element binding protein-1c expression in hepatic stellate cells. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 18(14):10–8, 2012.
- [126] Fan Yang, Yao Wang, Jun Xue, Qian Ma, Juan Zhang, Yun-Fei Chen, Zhen-Zhong Shang, Quan-Qiang Li, Shu-Ling Zhang, and Lei Zhao. Effect of Corilagin on the miR-21/smard7/ERK signaling pathway in a schistosomiasis-induced hepatic fibrosis mouse model. *Parasitology international*, 65(4):308–315, mar 2016.
- [127] Yue Yang, Bohkyung Kim, Young-Ki Park, Sung I Koo, and Ji-Young Lee. Astaxanthin prevents TGF $\beta$ 1-induced pro-fibrogenic gene expression by inhibiting Smad3 activation in hepatic stellate cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1850(1):178–85, jan 2015.

- [128] Katsunori Yoshida, Koichi Matsuzaki, Shigeo Mori, Yoshiya Tahashi, Hideo Yamagata, Fukiko Furukawa, Toshihito Seki, Mikio Nishizawa, Junichi Fujisawa, and Kazuichi Okazaki. Transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor signal via c-Jun N-terminal kinase-dependent Smad2/3 phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury. *The American journal of pathology*, 166(4):1029–1039, 2005.
- [129] Fujun Yu, Yong Guo, Bicheng Chen, Peihong Dong, and Jianjian Zheng. MicroRNA-17-5p activates hepatic stellate cells through targeting of Smad7. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 95(7):781–9, 2015.
- [130] Jorge G T Zañudo and Réka Albert. An effective network reduction approach to find the dynamical repertoire of discrete dynamic networks. *Chaos*, 23(2), 2013.
- [131] E M Zardi, L Navarini, G Sambataro, P Piccinni, F M Sambataro, C Spina, and A Dobrina. Hepatic PPARs: their role in liver physiology, fibrosis and treatment. *Current medicinal chemistry*, 20(27):3370–96, 2013.
- [132] Xuguang Zhai, Haowen Qiao, Wei Guan, Ziqiang Li, Yuanyuan Cheng, Xin Jia, and Yajun Zhou. Curcumin regulates peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  expression by AMPK pathway in hepatic stellate cells in vitro. *European journal of pharmacology*, 746:56–62, jan 2015.
- [133] Xuguang Zhai, Kunfeng Yan, Jiye Fan, Minghui Niu, Qian Zhou, Yan Zhou, Hongshan Chen, and Yajun Zhou. The  $\beta$ -catenin pathway contributes to the effects of leptin on SREBP-1c expression in rat hepatic stellate cells and liver fibrosis. *British Journal of Pharmacology*, 169(1):197–212, 2013.
- [134] Shuxin Zhan, Che Chang Chan, Berrin Serdar, and Don C. Rockey. Fibronectin Stimulates Endothelin-1 Synthesis in Rat Hepatic Myofibroblasts via a Src/ERK-Regulated Signaling Pathway. *Gastroenterology*, 136(7):2345–2355, 2009.
- [135] Feng Zhang, Desong Kong, Li Chen, Xiaoping Zhang, Naqi Lian, Xiaojing Zhu, Yin Lu, and Shizhong Zheng. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  interrupts angiogenic signal transduction by transrepression of platelet-derived growth factor- $\beta$  receptor in hepatic stellate cells. *Journal of cell science*, 127(Pt 2):305–14, 2014.
- [136] Feng Zhang, Yin Lu, and Shizhong Zheng. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  cross-regulation of signaling events implicated in liver fibrogenesis. *Cellular Signalling*, 24(3):596–605, 2012.
- [137] Lei Zhang, Changwei Liu, Xiao ming Meng, Cheng Huang, Fengyun Xu, and Jun Li. Smad2 protects against TGF- $\beta$ 1/Smad3-mediated collagen synthesis in human hepatic stellate cells during hepatic fibrosis. *Mol. Cell Biochem.*, 400:17–28, 2015.
- [138] Ranran Zhang, Mithun Vinod Shah, Jun Yang, Susan B Nyland, Xin Liu, Jong K Yun, Réka Albert, and Thomas P Loughran. Network model of survival signaling in large granular lymphocyte leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(42):16308–16313, 2008.
- [139] Wei Zhang, Minghui Niu, Kunfeng Yan, Xuguang Zhai, Qian Zhou, Li Zhang, and Yajun Zhou. Stat3 pathway correlates with the roles of leptin in mouse liver fibrosis

- and sterol regulatory element binding protein-1c expression of rat hepatic stellate cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(3):736–744, 2013.
- [140] Caiyan Zhao, Wei Chen, Liu Yang, Lihong Chen, Stephen a. Stimpson, and Anna Mae Diehl. PPAR $\gamma$  agonists prevent TGF $\beta$ 1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350(2):385–391, 2006.
- [141] Shizhong Zheng and Anping Chen. Activation of PPAR $\gamma$  is required for curcumin to induce apoptosis and to inhibit the expression of extracellular matrix genes in hepatic stellate cells in vitro. *Biochemical Journal*, 384(Pt 1):149–157, 2004.
- [142] Yajun Zhou, Xin Jia, Jianbing Qin, Cuihua Lu, Huixia Zhu, Xiangyang Li, Xiao Han, and Xiaoliang Sun. Leptin inhibits PPAR $\gamma$  gene expression in hepatic stellate cells in the mouse model of liver damage. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 323(2):193–200, 2010.
- [143] Yajun Zhou, Xin Jia, Guohua Wang, Xin Wang, and Jie Liu. PI-3 K/AKT and ERK signaling pathways mediate leptin-induced inhibition of PPAR $\gamma$  gene expression in primary rat hepatic stellate cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 325(1-2):131–139, 2009.