

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Identificación de reacciones controladoras en un modelo computacional multi-ómico astrocitario de lipotoxicidad inducida por ácido palmítico

María Andrea Angarita Rodríguez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de ingeniería de sistemas e industrial
Bogotá, Colombia
2022

Identificación de reacciones controladoras en un modelo computacional multi-ómico astrocitario de lipotoxicidad inducida por ácido palmítico

María Andrea Angarita Rodríguez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Bioinformática

Director:

Ph.D. Andrés Mauricio Pinzón Velasco

Codirectora:

Ph.D. Janneth González Santos

Línea de Investigación:

Biología de Sistemas

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Bioinformática y Biología de Sistemas - GIBBS

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de ingeniería de sistemas e industrial

Bogotá, Colombia 2022

(Lema)

Necesitamos especialmente de la imaginación en las ciencias. No todo es matemáticas y no todo es simple lógica, también se trata de un poco de belleza y poesía.

Maria Montessori

Declaración de obra original

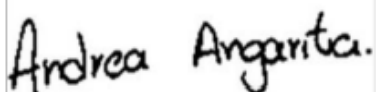
Yo declaro lo siguiente: He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor.

Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



María Andrea Angarita Rodríguez

C.C. 1.075.676.303

mangaritar@unal.edu.co

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, a la Facultad de Ingeniería, Departamento de ingeniería de sistemas e industrial.

A los profesores Andrés Mauricio Pinzón Velasco y Janneth González Santos, por brindarme su confianza, apoyo y enseñanzas los cuales me han permitido crecer personal y profesionalmente.

A la Pontificia Universidad Javeriana- Sede Bogotá y a Minciencias que bajo la convocatoria 874 de 2020 “Convocatoria para el Fortalecimiento de Proyectos en Ejecución de CTel en Ciencias de la Salud con Talento Joven e Impacto Regional” financiaron el proyecto número 9307, dentro del cual se encuentra enmarcado este trabajo.

A Juan José Rubio, Nicolás Mendoza Mejía y Juan Manuel Matíz por su ayuda incondicional en la realización de este proyecto.

A mi familia, por acompañarme en todo mi proceso personal y profesional.

Resumen

Identificación de reacciones controladoras en un modelo computacional multi-ómico astrocitario de lipotoxicidad inducida por ácido palmítico

Los astrocitos juegan un papel importante en varios procesos en el cerebro, incluidas condiciones patológicas como las enfermedades neurodegenerativas. Estudios recientes han demostrado que el aumento de ácidos grasos saturados como el ácido palmítico (PA) desencadena vías proinflamatorias en el cerebro. El uso de neuroesteroides sintéticos como la tibolona ha demostrado mecanismos neuroprotectores. Sin embargo, faltan estudios amplios, con un punto de vista sistémico, sobre el papel neurodegenerativo de PA y los mecanismos neuroprotectores de la tibolona. En este estudio, realizamos la integración de datos multiómicos (transcriptoma y proteoma) en un modelo metabólico a escala genómica de astrocitos humanos para estudiar la respuesta astrocitaria durante el tratamiento con palmitato. Evaluamos los flujos metabólicos en tres escenarios (saludable, inflamación inducida por PA y tratamiento con tibolona bajo inflamación por PA). También aplicamos un enfoque de teoría de control para identificar aquellas reacciones que ejercen más control en el sistema astrocítico. Por último, analizamos las cavidades de las enzimas asociadas a estas reacciones para determinar sus potenciales sitios de unión caracterizándolos en función de puntajes de ligandabilidad y capacidad de interacción farmacológica (drogabilidad).

Nuestros resultados sugieren que PA genera una modulación del metabolismo central y secundario, mostrando un cambio en el uso de la fuente de energía a través de la inhibición del ciclo del folato, la β -oxidación de ácidos grasos y la regulación positiva de la formación de cuerpos cetónicos. Encontramos 25 interruptores metabólicos bajo regulación celular mediada por PA, 9 de los cuales fueron críticos solo en el escenario inflamatorio pero no en el protector de tibolona. Dentro de estas reacciones, los perfiles de acoplamiento inhibitorio, total y direccional fueron hallazgos clave, que desempeñaron un papel fundamental en la desregulación de las vías metabólicas que pueden aumentar la neurotoxicidad. De los 25 interruptores metabólicos 16 presentaron cavidades potencialmente drogables que, a su vez, contienen el sitio activo de la proteína. En su

conjunto, estas 16 enzimas se configuran como potenciales objetivos terapéuticos. Finalmente, el marco general de nuestro enfoque facilitó la comprensión de la regulación metabólica compleja y puede usarse para la exploración *in silico* de los mecanismos de regulación de las células astrocitarias, y potencialmente de otros tipos celulares, dirigiendo un trabajo experimental futuro más complejo en enfermedades neurodegenerativas.

Palabras clave: astrocitos, integración de datos, ácido palmítico, modelo computacional, multi-ómico, teoría de control, cavidades farmacológicas.

Abstract

Identification of controlling reactions in a astrocytic multi-omics computational model of palmitic acid-induced lipotoxicity

Our results suggest that PA generates a modulation of central and secondary metabolism, showing a change in the use of the energy source through the inhibition of the folate cycle, the β -oxidation of fatty acids and the positive regulation of the formation of fatty acids. ketone bodies. We found 25 metabolic switches under PA-mediated cellular regulation, 9 of which were critical only in the inflammatory but not in the protective tibolone scenario. Within these reactions, inhibitory, total, and directional coupling profiles were key findings, playing a critical role in the dysregulation of metabolic pathways that can increase neurotoxicity. Of the 25 metabolic switches, 16 presented potentially drugable cavities that, in turn, contain the active site of the protein. As a whole, these 16 enzymes are configured as potential therapeutic targets. Finally, the general framework of our approach facilitated the understanding of complex metabolic regulation and can be used for in silico exploration of regulatory mechanisms of astrocytic cells, and potentially other cell types, directing future more complex experimental work in diseases. neurodegenerative

Our results suggest that PA generates a modulation of central and secondary metabolism, showing a switch in energy source use through inhibition of folate cycle and fatty acid β -oxidation and upregulation of ketone bodies formation. We found 25 metabolic switches under PA-mediated cellular regulation, 9 of which were critical only in the inflammatory but not in the protective tibolone scenario. Within these reactions, inhibitory, total, and directional coupling profiles were key findings, playing a critical role in the dysregulation of metabolic pathways that can increase neurotoxicity. Of the 25 metabolic switches, 16 presented potentially druggable cavities that, in turn, contain the protein's active site. As a whole, these 16 enzymes are configured as potential therapeutic targets. Finally, the general framework of our approach facilitated the understanding of complex metabolic regulation. It can be used for in silico exploration of regulatory mechanisms of astrocytic cells, and potentially other cell types, directing future more complex experimental work in neurodegenerative diseases.

Keywords: Astrocytes, data integration, palmitic acid, computational model, multi-omics, control theory, drugable cavities.

Este Trabajo Final de maestría fue calificado en septiembre de 2022 por el siguiente evaluador:

Camilo Albeiro Suarez Méndez PhD.
Profesor Facultad de Minas
Universidad Nacional de Colombia

Contenido

	Pág.
Declaración de obra original	4
Introducción	3
1. Antecedentes.....	6
1.1 Astrocitos y su importancia en la homeostasis cerebral.....	6
1.1.1 Astrocito, lipotoxicidad y tibilona	8
1.2 Biología de sistemas y modelos metabólicos a escala genómica	10
1.3 Modelos a escala genómica y controlabilidad de sistemas.....	13
1.3.1 Astrocito y lipotoxicidad: asociación con GEMs	17
1.4 Identificación de Blancos moleculares: la puerta a la medicina sistémica.....	21
1.5 Detección de cavidades de proteínas blanco: implicación en la identificación de sitios alostéricos y predicción de la capacidad de unión a ligandos de tipo farmacológico	24
2. Pregunta de investigación.....	28
3. Objetivos.....	28
3.1 Objetivo General	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. Materiales y métodos.....	29
4.1 Contextualizar información ómica en un modelo metabólico a escala genómica de astrocito humano basado en información experimental con el fin de reflejar de la mejor manera posible la realidad biológica.	29
4.1.1 Anotación funcional y expresión diferencial	29
4.1.2 Integración: reglas de asociación.....	30
4.1.3 Mapeo de la expresión génica y la abundancia de proteínas en las reacciones	31
4.1.4 Reducción de dimensionalidad: PCA.....	32
4.1.5 Construcción de un modelo multi-ómico bajo escenarios metabólicos.....	33
4.1.6 Análisis de equilibrio de flujo (FBA).....	33
4.1.7 Identificación de cambios en el flujo metabólico entre escenarios	34

4.1.8	Identificación de reacciones esenciales	34
4.2	Identificar los nodos controladores en los modelos metabólicos a escala genómica multiómicos de astrocito control y astrocito sometido a escenarios de lipotoxicidad. ..	35
4.2.1	Control de flujos en la red multiómica de astrocitos	36
4.2.2	Muestreo de patrones de actividad de reacción y gráfico de acoplamiento de flujo	38
4.2.3	Gráfico de control y cálculo de reacciones de control	38
4.3	Identificar blancos terapéuticos asociados a los nodos controladores de la respuesta astrocitaria a escenarios de lipotoxicidad.	39
	Análisis de estructural	39
4.3.1	Obtención de estructura terciaria y ligandos asociados	39
4.3.2	Caracterización de cavidades con potencial drogable.....	40
5.	Resultados y Discusión	41
5.1	Redes contexto-específicas de astrocitos	41
5.2	Escenario inflamatorio.....	42
5.3	Escenario de tratamiento con tibolona-PA.....	49
5.4	Las reacciones controladoras en un modelo multiómico de astrocitos se obtienen mediante patrones de actividad de reacción y gráfico de acoplamiento de flujo.....	52
5.5	Reacciones controladoras en un modelo de astrocitos multiómicos en un escenario lipotóxico	54
5.6	Potenciales blancos terapéuticos asociados a los nodos controladores.....	62
6.	Conclusiones y perspectivas	69
6.1	Conclusiones.....	69
6.2	Perspectivas a futuro.....	70
6.3	Anexos.....	71
6.3.1	Datos transcriptómicos y proteómicos	71
	Bibliografía	78

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Representación esquemática de cambios conocidos en astrocitos en respuesta a PA en la enfermedad de Alzheimer.	9
Figura 2. Esquema de análisis de balance de flujo (FBA).	12
Figura 3. Representación del grafo de acoplamiento de flujo. Reacciones internas de la red metabólica.	15
Figura 4. Ilustración del concepto de análisis integrador de datos y su asociación con medicina sistémica.	22
Figura 5. Distribución de reacciones por subsistemas asociados al fenotipo metabólico para cada modelo metabólico generado.	41
Figura 6. Resumen de consumo de metabolitos.	42
Figura 7. Resumen de vías asociadas a reacciones bioquímicas que presentaron alta variabilidad de flujo en comparación con palmitato.	47
Figura 8. Resumen de vías asociadas a reacciones bioquímicas que presentaron alta variabilidad de flujo en comparación con tibolona.	50
Figura 9. Resumen de vías asociadas a reacciones bioquímicas que presentaron alta variabilidad de flujo en comparación con tibolona.	51
Figura 10. Agrupación de perfiles de acoplamiento de flujo.	53
Figura 11. Diagrama de Venn que muestra el número de reacciones asociadas en cada modelo con reacciones redundantes, intermitentes y críticas, y sus intersecciones.	55
Figura 12. Cambio en la frecuencia de acoplamiento de interruptores metabólicos en el modelo control frente al modelo lipotóxico.	56
Figura 13. La presencia de 25 interruptores metabólicos en el modelo lipotóxico permite identificar reacciones críticas.	58
Figura 14. Representación superficial de la estructura monomérica de la enzima 3-cetoacil-CoA tiolasa (Uniprot ID: P09110).	64
Figura 15. Cavidades detectadas con potencial drogable alostéricas al sitio de unión al ligando natural de la carnitina palmitoiltransferasa 2 (Uniprot ID: P23786).	67

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Modelos biológicos estudiados desde las perspectivas de teoría de control y biología de sistemas.....	15
Tabla 2: Modelos astrocíticos desarrollados desde las perspectivas de biología de sistemas.	19
Tabla 3. Ejemplos de aplicación de la medicina sistémica.....	23
Tabla 4. Ejemplos de servidores web recopilados relacionados con la detección de cavidades, el modelado de farmacóforos y la predicción de unión de ligandos covalentes.	26
Tabla 5. Conjunto de reacciones reguladas a la baja del metabolismo del sulfato de queratán después del tratamiento con PA.....	45
Tabla 6. Conjunto de reacciones del metabolismo del folato con potencial inflamatorio y alteraciones, identificadas a través de un análisis de esencialidad y variabilidad en el escenario inflamatorio con palmitato.	48
Tabla 7. Conjunto de reacciones críticas del modelo PA que tienen un papel divergente en los modelos sano y de tibalona.....	62

Introducción

Los astrocitos están involucrados en varias funciones que son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis del cerebro, así como en la captura y liberación de metabolitos para la protección neuronal (Buskila et al., 2019); Tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, los astrocitos juegan un papel crucial en la sinaptogénesis, liberación de neurotransmisores, neuroinflamación, eliminación de sustancias tóxicas, amortiguación y liberación espacial de K^+ , entre otros (Cabezas et al., 2012; González et al., 2020; Robertson, 2018; Volterra & Meldolesi, 2005). Un papel importante de los astrocitos y su interacción con las neuronas, se da durante el metabolismo de los ácidos grasos (AG) (De Carvalho & Caramujo, 2018; Hashimoto & Hossain, 2018). Uno de los ácidos grasos saturados más comunes y predominantes en el cuerpo humano es el ácido palmítico (PA) que en exceso genera lipotoxicidad. Esta condición metabólica induce la activación de vías proinflamatorias como NF- κ B, lo que resulta en una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF, IL-1, IL-6. Lo anterior desencadena respuestas patológicas como procesos inflamatorios, formación de ceramidas, estrés oxidativo (EO), entre otras (Carta et al., 2017; Fatima et al., 2019; Frago et al., 2017). En este contexto, estudios recientes han determinado la asociación entre PA y desregulación metabólica en astrocitos. Esto genera modificaciones en el correcto funcionamiento del sistema nervioso central por el cambio de ambiente glial y aumenta el riesgo de desarrollar demencias, como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Huntington (EH), enfermedad de Parkinson (PD), entre otros (Luterman et al., 2000; Melo et al., 2019; Ortiz-Rodriguez et al., 2019; Patil et al., 2006; Wong et al., 2014a).

Estudios recientes han descrito el papel crucial de los estrógenos neuroactivos, como la tibolona, como candidatos beneficiosos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Martin-jiménez & González, 2020). Además, la tibolona ha sido un tratamiento útil para la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas y ha tenido efectos antidepresivos (Arevalo et al., 2015; Crespo-Castrillo & Arevalo, 2020). Se ha demostrado que la tibolona reduce la fragmentación nuclear y la producción de especies reactivas de oxígeno, así como la activación de la vía de señalización Akt/GSK3 β que genera actividad antioxidante en cultivos neuronales, entre otros efectos (Dhandapani et al., 2005; Martin-

jiménez & González, 2020). Sin embargo, los estudios del metabolismo de los astrocitos en asociación con la lipotoxicidad y el tratamiento con tibolona se han centrado en descifrar elementos específicos a través de la simulación experimental, ignorando los mecanismos que pueden ocurrir en múltiples niveles de organización biológica (ómicas) y creando una falta de comprensión sobre la relación metabólica entre estas interacciones (Ravindran et al., 2019). En este aspecto, con el aumento y la disponibilidad de datos multiómicos a gran escala, existe un enorme potencial en los conocimientos biológicos que se pueden extraer de la integración de estos datos (Currais et al., 2015) como se ha hecho con otros organismos en el estudio de la respuesta a las condiciones ambientales cambiantes (Bardozzo et al. 2018). Por lo tanto, desarrollar una visión integral de los mecanismos implicados en el comportamiento cerebral implica enfoques sistémicos, que pueden evaluarse a través de representaciones matemáticas del metabolismo, como las redes metabólicas a escala del genoma (GEM, por sus siglas en inglés) (Basler & Nikoloski, 2011; Nielsen, 2017a). Estos modelos generalmente se construyen a partir de varias fuentes de datos (es decir, evidencia basada en la literatura, información de bases de datos biológicas, entre otros) y permiten la integración de datos multiómicos que apuntan al descubrimiento de vías y mecanismos moleculares afectados por un estado de enfermedad (Marttinen et al., 2019; Ramon et al., 2018; Rezola et al., 2015; Wörheide et al., 2021). Los GEM también han demostrado su eficacia para identificar reacciones metabólicas esenciales en un sistema metabólico y desentrañar el control celular, lo que conduce a la predicción de las relaciones genotipo-fenotipo (Basler et al., 2016; Sweetlove & George Ratcliffe, 2011). Sin embargo, los métodos convencionales utilizados para interrogar a estos modelos, como el análisis de balance de flujo y sus derivados, han demostrado ser generalmente sesgados, ya que restringen el espacio de flujo a un estado de referencia a priori al suponer que el organismo optimiza según un objetivo celular (Lewis et al., 2012; Schuetz et al., 2007). Por otro lado, los enfoques imparciales no requieren ningún conocimiento apriori de los objetivos celulares, permitiendo estudiar sistemáticamente el control de las redes metabólicas a gran escala, lo que ofrece información mecanicista sobre la regulación celular (Basler et al., 2016). Por lo tanto, mediante la aplicación de un enfoque imparcial, como la Teoría de Control, podemos identificar grupos de reacciones que están controladas directa o indirectamente por la célula para controlar aún más su actividad general, sin un conocimiento previo de los objetivos celulares (Basler et al., 2016; Basler & Nikoloski, 2011).

Por lo tanto, se encuentran con un enfoque computacional imparcial (Basler & Nikoloski, 2011; Terzer & Stelling, 2008).

Este enfoque nos permitió comprender el mecanismo del metabolismo astrocitario en condiciones lipotóxicas y tratamiento con tibolona. Además, demostró ser clave para proponer nuevos y mejores marcadores de activación/lesión astrocitaria, lo que lleva a una mejor comprensión de los aspectos biológicos involucrados en la degeneración neuronal. A pesar de su utilidad, no existen estudios previos que hayan aplicado un enfoque de teoría de control e integración multiómica sobre redes metabólicas para dilucidar los mecanismos asociados con fenómenos de enfermedades neurodegenerativas en GEM astrocíticos.

Este estudio tuvo como objetivo identificar las reacciones de control de la respuesta astrocitaria humana al PA en un GEM multiómico, mediante la actualización de un modelo de astrocito de alta calidad publicado previamente por nuestro grupo (Osorio et al., 2020a) y la integración de datos de transcriptoma y proteoma bajo dos tratamientos (control, bajo PA y bajo tratamiento con PA/tibolona). Usamos reglas de asociación y reducción de dimensionalidad para identificar reacciones que se activan o desactivan en el modelo específico del contexto. También aplicamos un enfoque de teoría de control para identificar aquellas reacciones de control que son clave para cambiar entre estados funcionales en el sistema. Por último, empleamos métodos de identificación y caracterización de cavidades drogables para la determinación de posibles blancos terapéuticos. Nuestros resultados mostraron cambios significativos en el metabolismo celular bajo diferentes tratamientos, activando mecanismos inflamatorios en el caso de la AP y posibles mecanismos protectores en el caso de la tibolona, además, identificamos proteínas que pueden constituir posibles blancos terapéuticos. Esta investigación sentará las bases para futuras investigaciones farmacológicas, encaminadas a crear terapias más eficaces, y en el campo del control, encaminadas a extender sus aplicaciones a los fenómenos biológicos.

1. Antecedentes

1.1 Astrocitos y su importancia en la homeostasis cerebral

A finales del siglo XIX el histólogo Lenhosék introdujo el término astrocito para referirse a una célula en forma de estrella; lo anterior permitió plantear el concepto de que los astrocitos eran eléctricamente silenciosos, y que además tenían funciones tan importantes como las células neuronales (Buskila et al., 2019). Así, en las últimas décadas se ha llevado una extensa investigación biológica, especialmente durante los últimos 25 años (Wong et al., 2014a). Los avances han establecido que los astrocitos realizan una gran cantidad de funciones, dentro de las cuales se ha descrito su versatilidad de respuesta a los estímulos percibidos en su microambiente celular, así como, su reacción a las moléculas liberadas por neuronas y otras células del cerebro (Hidalgo-Lanussa et al., 2020; Ortiz-Rodriguez & Arevalo, 2020; Ying et al., 2019). Lo anterior se debe a que, estas células son un grupo heterogéneo, con al menos 11 subtipos principales en los mamíferos y por lo tanto, cumplen diferentes papeles en el sistema nervioso central (Herculano-Houzel & Dos Santos, 2018; Verkhratsky & Butt, 2018). El primer grupo clásico contiene los astrocitos protoplásicos en la sustancia gris y numerosas ramas, y el segundo grupo son los astrocitos fibrosos en la sustancia blanca, estos están asociados con los tractos axonales mielinizados y están relacionados con los nodos de Ranvier. Estudios recientes han aumentado la clasificación de los astrocitos como: astrocitos asociados a la superficie, astrocitos velados, astrocitos de Gomori, astrocitos perivasculares y marginales, astrocitos radiales, astrocitos interlaminares, astrocitos polarizados y astrocitos de proyección varicosa; estos tres últimos subtipos de células están solo en el cerebro de humanos (Souza et al., 2019; Verkhratsky, A., and Nedergaard, 2018; Verkhratsky & Butt, 2018). Sin embargo, se han reconocido clases adicionales de poblaciones de astrocitos como: la glía de Muller, la glía de Bergmann, la glía perivascular, la glía ependimaria y la glía marginal (Matyash & Kettenmann, 2009).

Desde el punto de vista arquitectónico, los astrocitos se acoplan de manera similar a un mosaico asociada con la heterogeneidad funcional y morfológica de estos (Allen et al.,

2018; Verkhratsky, A., and Nedergaard, 2018). Estas células tienen la capacidad de coordinarse con las células vecinas en el SNC y representan al menos la mitad de los contactos sinápticos en el cerebro humano, donde pueden ejercer contacto con más de 2 millones de sinapsis tripartitas (Allen et al., 2018). Además, esta arquitectura es fundamental para la función y regulación metabólica del cerebro y el acoplamiento neurovascular. Así, los astrocitos han sido posicionados como células importantes en la homeostasis del cerebro, donde, sus roles clave van desde la regulación sináptica (sinapsis tripartita), mantenimiento, poda y remodelación de sinapsis en el desarrollo hasta la contribución en procesos de envejecimiento y desarrollo de enfermedades (Buskila et al., 2019).

La evidencia emergente de la última década ha exhibido la multiplicidad de funciones dirigidas a mantener la homeostasis cerebral (A. Singh et al., 2019). Investigadores como (J. E. B. and M. V. Sofroniew, 2015) se han centrado en el papel de la gliólisis reactiva, la cual implica reacciones complejas entre células de diversos linajes como la microglía. Sin embargo, existen otros mecanismos modulados por los astrocitos para proteger el SNC en condiciones basales y después de una lesión. Por ejemplo, los astrocitos han sido estudiados, por su tarea de amortiguar iones de potasio K^+ generados por las neuronas mediante estimulación intensiva (Wong et al., 2014a). Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en el estudio del uso de iones de calcio y vías de señalización relacionadas para integrar información molecular de los astrocitos (Fatima et al., 2019; Y. Kim et al., 2019). Es importante mencionar que la liberación de gliotransmisores se modula a través de cambios de concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y vesículas sinápticas que involucran un mecanismo de regulación estrictamente controlado (Han et al., 2020). Estudios recientes han evidenciado al menos siete mecanismos mediante los cuales los astrocitos protegen el sistema nervioso (Bylicky et al., 2018; Cummings et al., 2014), evidenciando el papel de los astrocitos en la degradación de cúmulos malignos de proteínas beta-amiloide (Xiao et al., 2014) y alfa-sinucleína (Fellner et al., 2013), típicos de Alzheimer (AD) y Parkinson (PD), respectivamente. Adicionalmente, se ha probado que estas células regulan los niveles de K^+ (Tong et al., 2014) y previenen la excitotoxicidad (Lee et al., 2013) en la enfermedad de Huntington (HD). Sin embargo, a pesar de ser uno de los mecanismos más estudiados, aún se desconocen en totalidad los mecanismos moleculares que

gobiernan la influencia de los astrocitos en la actividad sináptica (Buskila et al., 2019; Wong et al., 2014a).

1.1.1 Astrocito, lipotoxicidad y tibilona

Debido a la gran cantidad de funciones que realizan los astrocitos y su rol en la homeostasis cerebral, estos pueden modular respuestas morfológicas y moleculares en respuesta a una lesión o agresión (Michael Hay, David W Thomas, John L Craighead, 2009). Se ha encontrado que, ante ciertos estímulos, los astrocitos pueden potenciar la neurodegeneración mediante la inducción de especies reactivas de oxígeno (Hidalgo-Lanussa et al., 2020), incremento en la producción de citocinas proinflamatorias (Matias et al., 2019), así como interleucinas (IL)-1 β , IL-6, y TNF- α (Crespo-Castrillo & Arevalo, 2020), inhibición enzimática (Hidalgo-Lanussa et al., 2020) y el decrecimiento de la viabilidad celular, entre otros (J. E. B. and M. V. Sofroniew, 2015).

Estudios como los realizados por (Ortiz-Rodriguez et al., 2019) han demostrado que el exceso de ácidos grasos saturados (lipotoxicidad) aumenta la activación de la microglía y los astrocitos, así como la expresión de factores neuroinflamatorios, acelerando el deterioro de procesos de aprendizaje y memoria. Respaldando lo anterior, (Luterman et al., 2000), han establecido una fuerte relación entre la inflamación crónica desatada por mediadores inflamatorios como IL - 1 β y ciclooxigenasa - 2 por ácidos grasos saturados y el desarrollo de EA (Figura 1). Además, se ha demostrado que ácidos grasos como el ácido palmítico (PA) y el ácido esteárico aumentan la secreción del péptido amiloide A β (2,8,38). Además, estudios realizados por (Jacobs & Tavitian, 2012) han demostrado que los astrocitos pueden desempeñar un papel crítico en respuesta a los ácidos grasos. Lo anterior, debido a la producción de varias citocinas y factores proinflamatorios como, TNF- α , IL-6 y C1q, que tienen la capacidad de conducir a la neuroinflamación y generar muerte celular, demostrando el papel regulador de los astrocitos en eventos como la proliferación y diferenciación celular. Además, factores como la IL-1 β secretada por la microglía en eventos de lipotoxicidad, conducen a la elevación de la concentración de GSK-3 β en las neuronas e induciendo al fenotipo astrocítico A1, el cual presenta la pérdida de la estimulación de la supervivencia neuronal, la sinaptogénesis y la fagocitosis (Hidalgo-Lanussa et al., 2020; Jacobs & Tavitian, 2012; Segrè et al., 2002; Valenza et al., 2011).

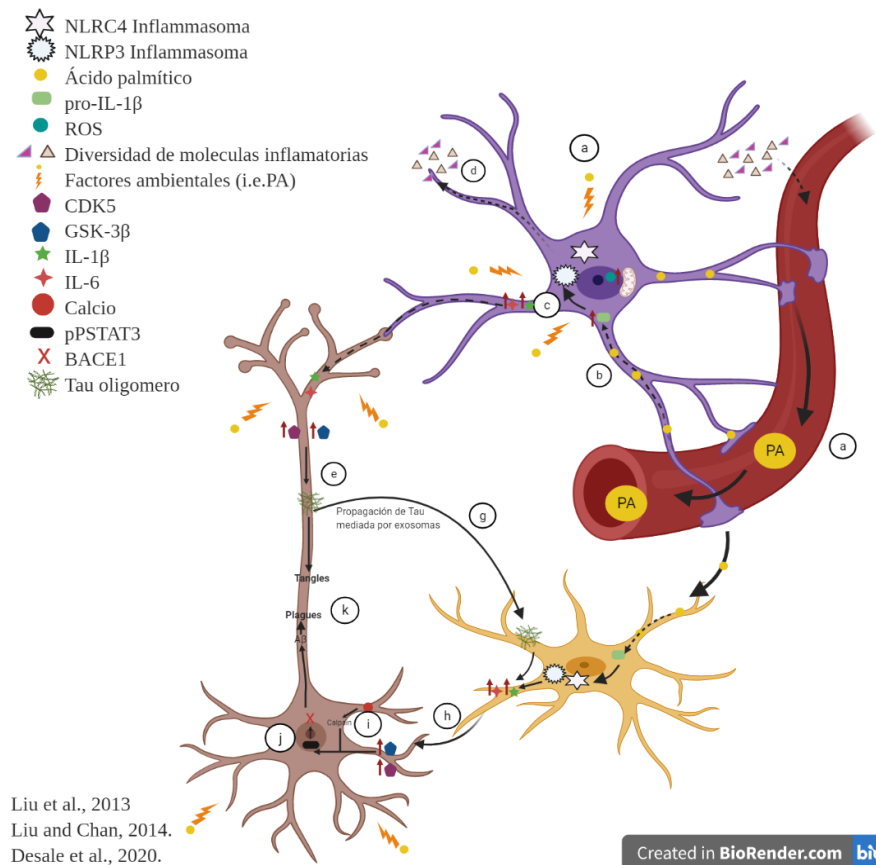


Figura 1: Representación esquemática de cambios conocidos en astrocitos en respuesta a PA en la enfermedad de Alzheimer. a) Daño asociado a factores ambientales como ácidos grasos libres (AG) elevados; b) PA inicia la activación de inflammasomas NLRP3 y NLRC4 en astrocitos o células de microglia para liberar moléculas inflamatorias como IL-1β, IL-6 y moléculas inflamatorias más diversas; c) Las citocinas inflamatorias juegan un papel clave en la potenciación de la patología de Tau por la expresión de las quinasas dependientes de fosforilación CDK5 y GSK-3β en neuronas aumentando la hiperfosforilación de Tau; e) La hiperfosforilación de Tau genera un desprendimiento de microtúbulos y agregados en forma de oligómeros; f) Los agregados de Tau diseminados dentro de la neurona provocan un efecto de siembra de Tau; g) La propagación mediada por exosomas es uno de los mecanismos de propagación de Tau. Los exosomas son captados por microglia y pueden volver a liberarse en el cerebro mejorando la propagación de Tau. Además, los astrocitos h) tratados con palmitato elevan la expresión de las quinasas dependientes de fosforilación CDK5 y GSK-3β y aumentan el nivel de calcio en las neuronas; i) los niveles de calcio aumentan la actividad de la calpaína, posteriormente la calpaína potencia p25 / Cdk5 que transloca pSTAT3 al núcleo; j) los niveles elevados de STAT3 podrían incrementar transcripcionalmente BACE1 y presenilina-1; k) Lo anterior da como resultado un aumento de los ovillos neurofibrilares y la amiloidogénesis en las neuronas; d) En conjunto, las diversas moléculas inflamatorias inducen a otras células como monocitos a cruzar la BHE y liberar moléculas inflamatorias más diversas.

En este contexto, se han evaluado compuestos estrogénicos como la tibolona, debido a que han demostrado efectos beneficiosos en enfermedades degenerativas y crónicas (Ávila et al., 2014; Modelska & Cummings, 2015). La tibolona, actúa mediante su unión a receptores de estrógeno, andrógeno o progesterona y ejerce efectos protectores al reducir la muerte celular de los astrocitos y los mecanismos de señalización de estrés oxidativo (Hidalgo-Ianussa et al., 2017). Autores como (Farfa & Gallardo, 2014) han demostrado que la tibolona mejora los déficits cognitivos, mediante la protección del hipocampo en ratas macho expuestas al ozono. A nivel *in vitro*, se ha demostrado que la tibolona ejerce efectos protectores en células gliales, ya que, reduce la inflamación y previene el daño oxidativo en la microglía expuesta por ácido palmítico, reduciendo el estrés oxidativo y preservando el potencial de la membrana mitocondrial (Crespo-Castrillo et al., 2018).

1.2 Biología de sistemas y modelos metabólicos a escala genómica

La curiosidad por el entendimiento del fenotipo metabólico y su relación con los múltiples factores que trabajan juntos en un organismo ha crecido rápidamente durante las últimas décadas. La implementación de nuevas técnicas moleculares y su constante mejora han permitido obtener datos ómicos con mejores niveles de curación que, junto a su registro en base de datos, ha permitido llevar a la investigación a escalas sistémicas (Becerra-Calixto & Cardona-Gómez, 2017; P. Chen et al., 2018; Wuchty, 2019). Este paradigma, definido como biología de sistemas, abarca un campo interdisciplinario con la premisa de crear una comprensión holística de las células, organismos y comunidades (González et al., 2020). Así, la biología de sistemas junto a los avances tecnológicos en la secuenciación de ADN de próxima generación (Bélanger & Magistretti, 2009), mediciones del transcriptoma mediante RNA-seq (M. V. Sofroniew, 2014), entre otras han aumentado en gran cantidad la recopilación de datos multi-ómicos (Becerra-Calixto & Cardona-Gómez, 2017; Nielsen, 2017a). Lo anterior, ha proporcionado la motivación científica de combinar datos generados a partir de múltiples enfoques ómicos como: metabolómica transcriptómica, genómica y proteómica (Becerra-Calixto & Cardona-Gómez, 2017).

Por otra parte, el uso de modelos de redes metabólicas, generados en principio a través de la genómica (Hyduke et al., 2011) ha facilitado la compilación, integración y análisis de

datos multi-ómicos (Altenbuchinger et al., 2019). Una de las características más importantes de este tipo de modelado, es que cada reacción está asociada con una o más enzimas que son codificadas por genes específicos, llevando a la relación gen-proteína-reacción, permitiendo superponer diferentes datos ómicos (González et al., 2020). GEMs han constituido una herramienta valiosa, ya que han sido ampliamente empleados para el estudio de fenotipos celulares, siendo utilizados para analizar el metabolismo a nivel sistémico (Becerra-Calixto & Cardona-Gómez, 2017). Tal información tiene importantes implicaciones en la comprensión de los sistemas biológicos, en particular en el ámbito clínico (Y. Y. Liu et al., 2011).

Tradicionalmente, los GEMs han sido utilizados para simular fenotipos específicos y/o deseados de células u organismos, lo que permite contextualizar el metabolismo celular y su capacidad metabólica de acuerdo con condiciones ambientales e intrínsecas (Manninen et al., 2019). Estos modelos tienen la ventaja de que debido a su representación matemática y computacional, pueden ser interrogados por los mismos medios, y en general entendidos dentro del ámbito de la optimización lineal. Uno de los métodos más comúnmente usados para interrogar estos modelos es Análisis de Balance de Flujo (FBA), el cual permite evaluar los flujos intracelulares, para predecir estados metabólicos celulares termodinámicamente factibles bajo ciertas condiciones (Figura 2) (Orth et al., 2010). Lo anterior, permite seleccionar aquellos valores de flujo metabólico que, en suma, pueden optimizar la función objetivo que es biológicamente relevante para el organismo de estudio (Nielsen, 2017c; Pinu et al., 2019). Mediante la selección de restricciones, las cuales buscan acotar el espacio de solución de la optimización (Orth et al., 2010).

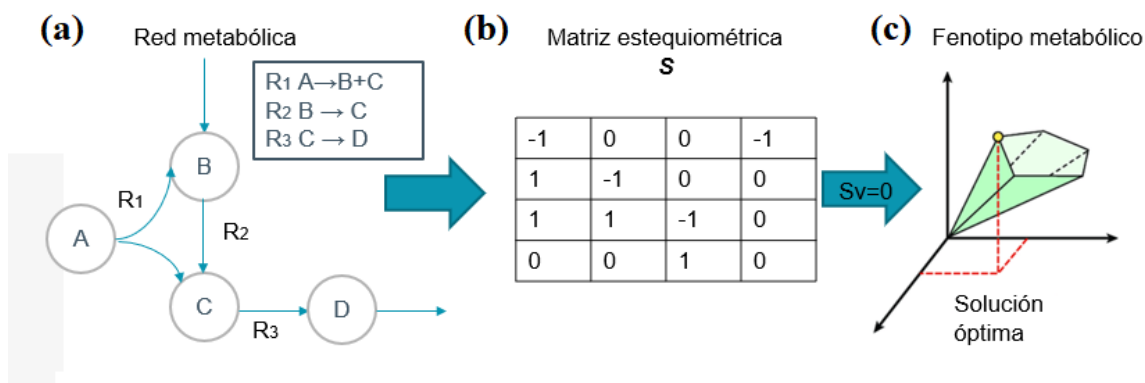


Figura 2. Esquema de análisis de balance de flujo (FBA). (a) En primer lugar, la red metabólica construida, consiste en una lista de reacciones bioquímicas (R1, R2, R3, Rn) estequiométricamente equilibradas. (b) Esta reconstrucción se convierte en un modelo matemático descrito como una matriz estequiométrica (etiquetada como **S**) donde cada Columna representa la reacción y cada fila representa un metabolito. En estado estacionario, el flujo a través de cada reacción está dado por la ecuación $Sv=0$, es decir, el cambio de las concentraciones de todos los metabolitos "x" en el tiempo es cero ($dx/dt=0$), donde el flujo a través de todas las reacciones está representado por el vector "v". (c) De acuerdo con las anteriores expresiones, se busca una maximización o minimización de una función objetivo, que puede ser cualquier combinación lineal de flujos para cada reacción, indicando cuánto contribuye cada reacción a la función objetivo. Por lo tanto, la optimización permite encontrar la distribución de flujos particular que permita encontrar la solución óptima para esta función objetivo mientras se observan las restricciones dado el principio de balance de masa y los límites de reacción (Orth et al., 2010; Osorio et al., 2020b).

Recientemente, autores como (Pinu et al., 2019; Thiele et al., 2013a) resaltan la extensión de estos modelos a modelos de interacción proteína-proteína, modelos de redes de reacciones metabólicas y redes genéticas reguladoras. Sin embargo, estos modelos siguen siendo "reduccionistas", en el sentido de que solo permiten el modelado de una única ómica (Palsson, 2009). Aun así, han sido la base para la creación de redes multicapa, para la representación sistémica de las interacciones específicas entre diferentes ómicas (Nielsen, 2017c). Lo anterior con la finalidad de: (1) integrar información reguladora de muchas partes o entradas del sistema y (2) transformar esta información para regular múltiples procesos o partes (Orth et al., 2010; Thiele et al., 2013b; Z. Wang et al., 2009).

Vale la pena mencionar que la integración de las ómicas en los GEMs permite mejorar la predictibilidad de estos, potenciando su interpretación y la extracción de información biológicamente relevante y novedosa (Nielsen, 2017b). Además, los datos ómicos basados en datos experimentalmente extraídos, se utilizan a menudo para reflejar la heterogeneidad de los perfiles biomoleculares y sus múltiples interacciones entre diferentes niveles celulares, permitiendo obtener predicciones cercanas a la realidad de los sistemas biológicos y los procesos moleculares (Jendoubi, 2021). Por lo tanto, los GEMs son una

herramienta integradora para las ómicas, De tal manera, se ha generado un interés creciente en la biotecnología, como, por ejemplo, la medicina personalizada para tratar enfermedades metabólicas como la obesidad, la resistencia a la insulina, la esteatohepatitis no alcohólica, el cáncer, entre otros (Nielsen, 2017b), a partir del entendimiento de mecanismos moleculares complejos.

1.3 Modelos a escala genómica y controlabilidad de sistemas

Como se ha establecido con anterioridad, debido al aumento de las tecnologías de secuenciación, las investigaciones modernas se han centrado en comprender cómo se controlan los sistemas biológicos mediante el modelado metabólico (Menara et al., 2017). Tal paradigma, ha permitido entender los sistemas complejos como la célula, desde una perspectiva holística, complementando el enfoque reduccionista ampliamente utilizado (Ravindran et al., 2019). Así, las redes metabólicas han pasado a ser una herramienta poderosa para la comprensión sistémica de los organismos (Price et al., 2004). Estas representaciones matemáticas han implicado la comprensión de los estados físico-químicos de las células que junto a la utilización del principio del estado estacionario, facilita las predicciones de las relaciones genotipo-fenotipo (Orth et al., 2011; Suthers et al., 2009) Además, las características topológicas de las redes contribuyen a la robustez y la flexibilidad de los sistemas complejos, analizables desde la perspectiva de la teoría de grafos, estadística, física y simulación computacional para el entendimiento de las relaciones entre la estructura y función de los distintos conjuntos de elementos que componen un sistema biológico.

Recientemente, la teoría de control de redes metabólicas ha permitido investigar los principios de control de las interacciones biológicas complejas a través de un conjunto mínimo de nodos de entrada (sitios de control) (Sajitz-Hermstein & Nikoloski, 2013). Los sitios de control son reacciones, ya que los autores cuantifican la contribución de estas reacciones en el modelo de interés en la distribución de flujos metabólicos (Sajitz-Hermstein & Nikoloski, 2013). Además, estas reacciones son sitios potenciales de control, ya que el efecto de su manipulación depende de la acción distribuida sobre varias reacciones

llevando a un efecto potencial sobre la función metabólica (por ejemplo, de un estado de virulencia a un estado menos virulento como es el caso del VIH)(Ravindran et al., 2019; Sajitz-Hermstein & Nikoloski, 2013). Así, el modelado matemático de procesos metabólicos ha permitido la identificación de sitios de control y su contribución en la funcionalidad de una red metabólica determinada (Basler et al., 2016). Lo anterior se debe a que, este enfoque sistémico permite entender las células como sistemas con elementos interconectados, permitiendo obtener propiedades emergentes no apreciables en estudios enfocados a elementos locales (Nielsen, 2017b). Estas propiedades emergentes son definidas como aquellas propiedades que surgen de la combinación de las propiedades y relaciones de los elementos individuales. En el campo del modelado, estas propiedades permiten predecir el comportamiento del sistema bajo diferentes escenarios. Así, la controlabilidad de redes metabólicas se abre como un campo nuevo pero poderoso, siendo así una ciencia robusta y activa enfocada en el control de sistemas (Schwartz et al., 2019; Wuchty, 2019).

La controlabilidad de sistemas o teoría de control se basa en fundamentos matemáticos que en nuestro caso es asociado al acoplamiento de flujo entre reacciones. La idea central de esta teoría es que una reacción activa puede controlar la actividad de otras reacciones, por lo que, al manipular esta reacción es posible controlar directamente una reacción a la que está acoplada. Así, la dinámica de nodos y la identificación de aquellos denominados controladores pueden generar información importante para identificar los controladores directos de la actividad de todas las reacciones de la red (Asgari et al., 2013; Guo et al., 2018; Sajitz-Hermstein & Nikoloski, 2013). Basler et al., (2016a) han desarrollado este enfoque para identificar el conjunto más pequeño de reacciones controladoras que ofrecen control sobre toda la red, por lo que se optimizan los acoplamientos cualitativos entre las reacciones. En este sentido, se ha propuesto que una reacción que tiene las cinco posibilidades de acoplamiento, es un nodo controlador crítico, que puede controlar toda la red. Sin embargo, se ha descrito que una reacción que cuenta con al menos tres tipos de acoplamientos (R1), puede usarse para controlar el flujo de otra reacción, como se observa en la figura 3.

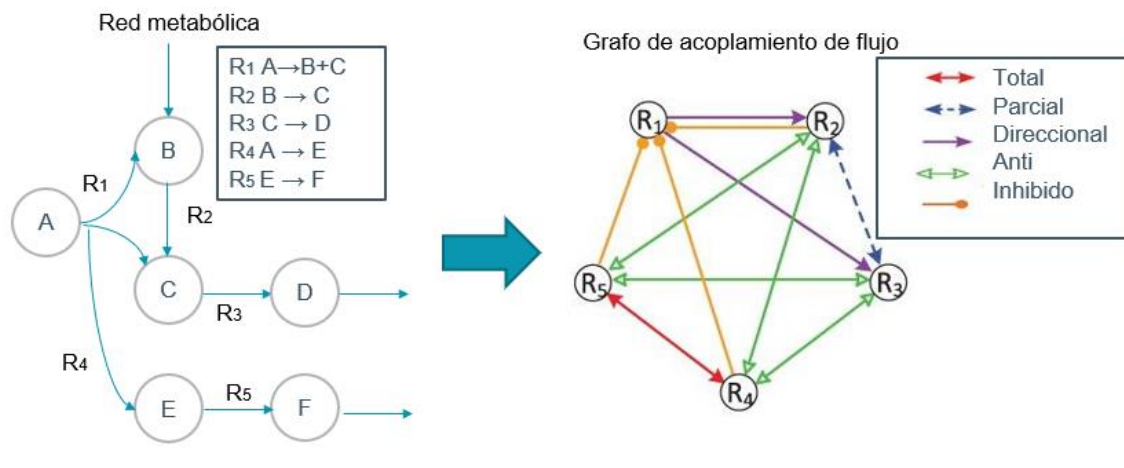


Figura 3. Representación del grafo de acoplamiento de flujo. Reacciones internas de la red metabólica. Los vértices representan reacciones y los bordes etiquetados representan las cinco relaciones de acoplamiento (representadas por diferentes colores; ver leyenda). El principio de estado estacionario implica que algunas reacciones operan de manera concentrada, lo que conduce a relaciones de acoplamiento de reacciones. Una reacción i está acoplada direccionalmente a j si $\sigma_j^v = 0$ implica $\sigma_i^v = 0$, donde el estado o patrón de actividad de reacción " σ ", está dado por el vector de flujo generado " v ". El acoplamiento parcial es un caso especial de acoplamiento direccional y total: dos reacciones, i y j , están parcialmente acopladas si tienen el mismo estado. Si una de las dos reacciones está inactiva, entonces un flujo de estado estable (distinto de cero) solo es posible si la otra reacción tiene un flujo distinto de cero, lo cual definiría a dos reacciones anti-acopladas. Por último, una reacción i se acopla de manera inhibitoria a una reacción j si un flujo máximo de reacción i implica que j está inactivo. Lo anterior se podría resumir de la siguiente manera: (1) un flujo direccional y total (o activo) de R1 conduce a la activación de R2 y R3 y la inactivación de R4 y R5; (2) un flujo inactivo de R1 conduce a la desactivación de R2 y la activación de R4 y R5; (3) un flujo inactivo de R1 conduce a la activación de R2 y la desactivación de R4. Tomado y modificado de Basler et al., (2016a).

Debido a la novedad de la controlabilidad de redes, son pocos los intentos de aplicar este enfoque a sistemas biológicos, sin embargo, los resultados de las diversas investigaciones marcan un precedente de la utilidad clínica de estas herramientas. Lo anterior se ha evidenciado en la construcción y mejoramiento de modelos como HepatoNet (modelo de hígado) (Gille et al., 2010), riñón (Chang et al., 2010), cerebro (Lewis & Abdel-Haleem, 2013), eritrocitos (Aarash Bordbar et al., 2011), entre otros. En la tabla 1 hemos recopilado algunos de los avances más representativos asociados al uso de la teoría de control con modelos biológicos. De hecho, con esta acumulación de conocimientos sobre el mecanismo molecular de las enfermedades y el desarrollo de diagnósticos, basados en la biología de sistemas, se han acuñado conceptos como la medicina P4 o Medicina sistémica (Nielsen, 2017b).

Tabla 1. Modelos biológicos estudiados desde las perspectivas de teoría de control y biología de sistemas.

Autor	Modelo	Estudio	Conclusión
(Sajitz-Hermstein & Nikoloski, 2013)	<i>E. coli</i>	Rescate de la red metabólica de <i>E. coli</i> de un fenotipo letal mediante la eliminación de algunos genes codificantes.	Estímulos puntuales a nivel local en la red son suficientes para cambiar el estado del sistema global.
(Bidkhorri et al., 2018)	Cáncer	Búsqueda de blancos terapéuticos.	Identificación de metabolitos y genes que pueden ser dirigidos para el tratamiento del cáncer mediante la combinación de la topología de la red y análisis de teoría de control identificando dianas objetivo como blancos terapéuticos.
(Ravindran et al., 2019)	Virus de inmunodeficiencia humano tipo 1 (VIH-1)	Identificación de nodos que conducen a la red del virus.	Análisis de controlabilidad para generar un modelo de virus de estado menos infeccioso.

Dentro de este contexto, estos estudios son un paso fundamental y revolucionario, debido a que estos han permitido el desarrollo de múltiples enfoques para el estudio de la controlabilidad de redes y la identificación de blancos para el tratamiento de enfermedades de manera holística (Nielsen, 2017b). Por ejemplo, (X. Liu & Pan, 2014), desarrollaron la *teoría de insumos mínimos* para caracterizar la controlabilidad estructural de las redes dirigidas, permitiendo identificar un conjunto mínimo de nodos control. En general, autores como (Kanhaiya, 2020) han permitido definir, de acuerdo a esta teoría, un sistema dinámico en un sistema controlable, si con una selección razonable de fuentes de entrada, se puede generar cualquier estado subyacente a cualquier estado final deseado. Los avances recientes en los enfoques enmarcados en la teoría de control asociado a las redes metabólicas han ofrecido un fuerte marco matemático y computacional para la investigación de relaciones estructurales y funcionales (Basler et al., 2016; Larhlimi et al., 2012; Yuan et al., 2013). El objetivo de identificar un número de entradas denominadas nodos controladores, además, es una herramienta poderosa para dirigir el sistema desde cualquier estado inicial a cualquier estado final de tipo finito (Basler et al., 2016b). Por lo tanto, los enfoques holísticos como los mencionados anteriormente para el estudio de enfermedades complejas, permiten centrarse en múltiples genes, mejorando el enfoque tradicional al identificar el objetivo cuya perturbación puede ser un resultado deseado para el tratamiento de una enfermedad de manera sistémica (Ravindran et al., 2019).

1.3.1 Astrocito y lipotoxicidad: asociación con GEMs

El estudio de la bioquímica del cerebro ha estado centrado en la comprensión de rutas metabólicas asociadas en su mayoría a las neuronas (Pandey et al., 2019; D. Singh & Lercher, 2020). Sin embargo, el cerebro es un sistema complejo comprendido por varios tipos de células que interactúan constantemente de manera coordinada (Bylicky et al., 2018). En los últimos años, se ha prestado atención a las células gliales, ya que también son esenciales para la funcionalidad cerebral, trabajando de forma coordinada con las neuronas (Maarleveld et al., 2013). Las células gliales se dividen en tres tipos principales de células: oligodendrocitos, microglía y astrocitos, donde estos últimos son las células más versátiles del sistema nervioso central (SNC) desempeñando funciones importantes en la plasticidad sináptica, homeostasis y neuroprotección (Bordel et al., 2010). Al mismo tiempo, los astrocitos están involucrados en la respuesta inflamatoria y desempeñan un papel clave en la progresión de enfermedades neurodegenerativas (Bordel et al., 2010; Segrè et al., 2002).

Una gran cantidad de estudios de modelos de ratón han determinado que los astrocitos desempeñan un papel complejo en la patogénesis de ENs y estos pueden contribuir a la muerte neuronal o al proceso de alteraciones neurales (Kohl et al., 2010; Wong et al., 2014a). Por ejemplo, se ha realizado una amplia investigación sobre la señalización de neurotransmisores, señalización de mensajeros, señalización paracrina, entre otros (Bordel et al., 2010). De lo anterior, se ha encontrado que los astrocitos pueden perder su papel de apoyo y adquirir una función tóxica en la progresión de ENs. De hecho, se ha estudiado la correlación entre la activación de células gliales con los cambios morfológicos y funcionales a partir de los procesos de inflamación crónica, en la que se ven involucradas vías de señalización y factores de transcripción relacionados con procesos apoptóticos, ROS, estrés del retículo endoplasmático, entre otros (Kohl et al., 2010).

Relacionado a lo anterior, se ha identificado una asociación entre la obesidad, la disfunción cognitiva y la integridad neuronal y glial (Hidalgo-Lanussa et al., 2020). Así, la lipotoxicidad, un fenómeno caracterizado por el aumento de los niveles de ácidos grasos puede producir la activación de diversas vías metabólicas en los astrocitos. Estudios recientes han demostrado que astrocitos cultivados en medios condicionados con ácido palmítico presentan colapso de potencial de membrana mitocondrial (Guo et al., 2018), generación

de ceramidas y subsecuente producción de citoquinas mediante la vida de la serina palmitoil transferasa (Hidalgo-Lanussa et al., 2020), liberación de TNF- α y IL-6, además de inducir la formación de ROS y apoptosis, entre otros (Michael Hay, David W Thomas, John L Craighead, 2009; Souza et al., 2019; Zahra et al., 2019). Todos ellos presentes en varias EN, cómo, la enfermedad de Alzheimer y EP (Durkee & Araque, 2019). Por tal motivo, estudiar la relación de los astrocitos y la lipotoxicidad, resulta en conocimiento provechoso que puede ser aplicado a EN.

El uso de herramientas computacionales, como los modelos y las bases de datos, han generado múltiples enfoques en los que se integran los datos experimentales con enfoques computacionales en el campo neurocientífico (Wong et al., 2014b). A pesar de la corta historia de la utilización de las herramientas computacionales, diferentes modelos computacionales se han desarrollado para estudiar la complejidad de los astrocitos. Los anteriores modelos, basados principalmente en los modelos de (G. W. De Young & Keizer, 1992), (Y. X. Li & Rinzel, 1994) y (Höfer et al., 2002), incluyen algunos modelos astrocíticos unicelulares, modelos dinámicos, modelos de redes, modelos de interacción neurona-astrocito, entre otros. En la tabla 2 hemos recopilado algunos de los modelos más representativos desarrollados para astrocitos. Sin embargo, estos modelos aún cuentan con muy poca información o son modelos genéricos, por lo cual no describen de qué región anatómica provienen los astrocitos del modelo, por lo que su reproducibilidad aún está en estudio.

Tabla 2: Modelos astrocíticos desarrollados desde las perspectivas de biología de sistemas.

Los modelos fueron agrupados en 4 categorías de acuerdo con el criterio del tipo de modelo computacional.

Modelo	Tipo de modelo computacional	Evento modelado
(Di Garbo et al., 2007)	Modelo de red mínima	Dinámica de la tasa de extrusión de calcio (Ca ²⁺) a través de la membrana del astrocito
Modelo	Tipo de modelo computacional	Evento modelado
(Silchenko & Tass, 2008)	Modelo de red mínima	Dinámica de Ca ²⁺ en astrocitos y su dependencia a la comunicación bidireccional entre otros astrocitos para el transporte de glutamato.
(Valenza et al., 2011)	Modelo Li-Rinzel	Dinámica de Ca ²⁺ en astrocitos
(Sertbaş et al., 2014)	Reconstrucción a escala genómica	Identificar características comunes para las enfermedades de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, esquizofrenia
(Martín-Jiménez et al., 2017)*	Reconstrucción a escala genómica	Elucidar una parte significativa del mapa metabólico del astrocito, mediante la caracterización del estado isquémico y normal.
(Osorio et al., 2020b)*	Reconstrucción a escala genómica	Estudiar el rol de la ticolona en astrocitos tratados con ácido palmítico.

*Desarrollados por nuestro grupo de trabajo.

En los últimos años, las investigaciones centradas en las redes metabólicas a escala genómica específicas del cerebro han ayudado a interpretar resultados experimentales a través de enfoques computacionales. (Martín-Jiménez et al., 2017) desarrollaron una reconstrucción a escala genómica de astrocitos humanos basadas en datos transcriptómicos, obtenidos de astrocitos corticales, y de datos registrados en el Atlas

metabólico humano (HMA) para estudiar el comportamiento astrocítico durante condiciones isquémicas al disminuir el consumo de oxígeno. De acuerdo a lo reportado por los autores, a partir de este modelo fue posible identificar cambios significativos en algunas enzimas antioxidantes, las cuales pueden estudiarse para la prevención de lesión cerebral durante la isquemia (Siracusa et al., 2019). Es importante destacar que esta información, así como los modelos previamente estudiados, son andamios para el análisis de hipótesis computacionales. Por lo tanto, es importante destacar el modelo computacional realizado por (Osorio et al., 2020a) en el cual se probó el efecto de la tibolona durante la inflamación inducida por lipotoxicidad por el PA. En este modelo los autores simularon tres escenarios, los cuales eran: escenario "saludable", un escenario de inflamación inducida por palmitato y tratamiento con tibolona en un escenario de inflamación. Estos autores describieron que el modelo tenía un comportamiento similar al de (Martín-Jiménez et al., 2017) y (Sertbaş et al., 2014). Además, el modelo permitió identificar efectos protectores contra la inflamación, el estrés oxidativo y la desregulación metabólica (P. Chen et al., 2018). Por lo tanto, estos modelos son una herramienta que puede integrar datos multi-ómicos para el estudio de enfermedades neurodegenerativas en múltiples escalas.

De hecho, en las últimas décadas, varias investigaciones se han centrado en la dinámica y estructura de los sistemas complejos, especialmente los sistemas biológicos. La interdisciplinariedad y multidisciplinariedad ha llevado a la búsqueda conjunta entre ciencia e ingeniería de redes, para el entendimiento de la controlabilidad de sistemas (Menara et al., 2017; Ravindran et al., 2019; Sajitz-Hermstein & Nikoloski, 2013; Yuan et al., 2013). Dado que, a nivel experimental, dicha controlabilidad está oculta, es difícil estudiar la controlabilidad desde una perspectiva no lineal. Sin embargo, el desarrollo de análisis enfocados a la teoría de control, han propuesto esquemas para sistemas dinámicos no lineales (Yuan et al., 2013). En las últimas décadas, se han desarrollado algoritmos eficientes con tiempo polinómico para la abstracción y análisis de nodos necesarios para el control de cualquier red, sin importar su dimensión (Menara et al., 2017). Sin embargo, el control de redes no homogéneas, como la mayoría de las redes bioquímicas, aún es un desafío. Así, se abre la puerta a la identificación y reversión de los efectos negativos de la lipotoxicidad en los astrocitos, impactando en gran medida en la investigación en EN. Por consiguiente, se ha abierto la posibilidad de integrar las metodologías anteriormente mencionadas junto a la información multi ómica de la respuesta astrocitaria bajo escenarios

de lipotoxicidad con el GEM astrocitario. Abriendo la puerta a análisis novedosos con relevancia terapéutica, capaces de brindar información valiosa sobre blancos o biomarcadores para revertir los efectos negativos de la lipotoxicidad en los astrocitos, impactando a su vez en la investigación en enfermedades neurodegenerativas.

1.4 Identificación de Blancos moleculares: la puerta a la medicina sistémica

La acumulación de conocimientos sobre los mecanismos moleculares de muchas enfermedades y el desarrollo de tecnologías novedosas para un diagnóstico más eficiente ha generado un interés creciente en pasar del tratamiento de enfermedades en estados ya avanzadas, la práctica actual, a la prevención de enfermedades o tratamientos en etapas tempranas, ya que esto reduciría significativamente los costos en el sector salud (Hood & Friend, 2011). Lo anterior se debe a que la mayoría de las terapias utilizadas actualmente se han desarrollado basado en ensayos experimentales, limitados en su mayoría por el enfoque reduccionista y ensayos clínicos que involucran grandes cohortes en donde se asume que todos los involucrados responderán de manera similar. Esto ignora el hecho de que existen diversos factores genéticos y ambientales que generan respuestas diferenciales entre individuos (Yousofshahi et al., 2013). Por lo tanto, en la actualidad se requiere que los blancos identificados tengan una verdadera fuerza predictiva (Hood et al., 2004). Lo anterior ha trascendido a la biología de sistemas para abarcar múltiples disciplinas e involucrarse en la promoción de la salud (Figura 3) (Nielsen, 2017b).

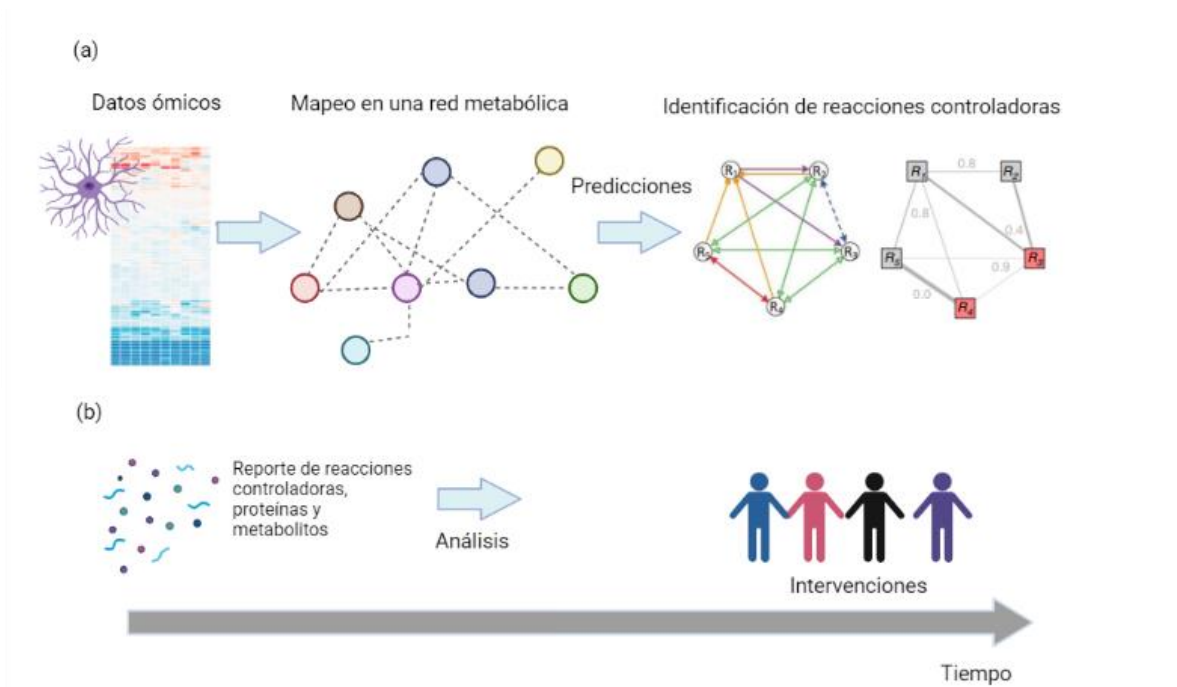


Figura 4. Ilustración del concepto de análisis integrador de datos y su asociación con medicina sistémica. (a) Ilustración de cómo un modelo metabólico a escala genómica (GEM) específico de una célula astrocitaria, puede ser implementado para el análisis integrador de datos ómicos (transcriptoma, proteoma o metaboloma). Superponiendo estos datos en el GEM, es posible realizar predicciones que, junto a la implementación de teorías, como la teoría de control, es posible identificar reacciones controladoras, metabolitos y proteínas informadoras. (b) El reporte de los datos de reacciones controladoras, proteínas y metabolitos deben ser analizados a escala de macrodatos para la identificación de biomarcadores que se pueden utilizar para la estratificación en la clínica. Estos biomarcadores son, por ejemplo, metabolitos o proteínas, que pasan un cierto nivel cuando se desarrollan procesos celulares específicos, cambiado en relación con el inicio o la progresión de la enfermedad. Tomado y modificado de (Nielsen, 2017b).

Sin embargo, el avance de la medicina de sistemas aún enfrenta varios desafíos:

1. El desafío de analizar grandes conjuntos de datos;
2. Las dificultades de la identificación de las causas mecanicistas de muchos biomarcadores;
3. El problema con la traducción de GEM a la clínica;
4. El problema de la heterogeneidad de las muestras.

Otro desafío es que los datos multi-ómicos representan diferentes tipos de información con escalas de tiempo en su mayoría diferentes (Hood et al., 2004). Los metabolitos, así como las proteínas y el ARNm cambian en el tiempo, ya sea por modificaciones

postraduccionales, procesos fisiológicos en diferentes tejidos, la actividad metabólica, entre otros (Hood & Friend, 2011; Nielsen, 2017b). Sin embargo, como se observa en la tabla 3, son varios los estudios asociados al análisis de sistemas biológicos de tejidos humanos han demostrado su potencial para la identificación de biomarcadores que han sido validados posteriormente.

Tabla 3. Ejemplos de aplicación de la medicina sistémica.

La medicina de sistemas ha permitido la identificación de cambios en partes específicas de una red metabólica, dando como resultado alteraciones en el metabolismo.

Autor	Modelo (GEM)	Objetivo	Conclusión
(Gulsen et al., 2005)	Hepatocitos	Estudiar la reprogramación metabólica en respuesta a desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD)	los pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) no pueden disminuir la expresión de genes que codifican enzimas en biosíntesis de serina y glicina, que puede explicar la observación de niveles elevados de homocisteína plasmática y niveles disminuidos de fosfatidilserina en el hígado
(Mardinoglu et al., 2013)	HMR2 (modelo de reacción metabólica de humano 2) aplicado a células renales	Encontrar un biomarcador para el pronóstico de carcinoma de células renales	Este tipo de cáncer de riñón tiene una reprogramación metabólica distintiva entre todos los cánceres. Esto asociado a una alta disregulación de la síntesis de heparán y condroitina sulfato, siendo estos un biomarcador tanto para la identificación de la enfermedad como para la predicción de la agresividad del tumor.
(Mardinoglu et al., 2014)	HMR2 (modelo de reacción metabólica de humano 2), junto a una red proteína-proteína asociada a pacientes con resistencia a la insulina	análisis de datos de transcriptoma y proteoma para resistencia a la insulina	Esto resultó en la identificación del metabolismo de la manosa es significativamente alterado en pacientes resistentes a la insulina, y posterior análisis de metabolómica de más de 1.000 sujetos podría validar manosa como un nuevo biomarcador de resistencia a la insulina

Si bien, aún quedan muchos vacíos en este tipo de estudios, la medicina sistémica ha demostrado su potencial en la búsqueda dirigida de biomarcadores que estén asociados a

alteraciones estadísticamente significativas en las redes metabólicas. Lo anterior genera hipótesis acerca de ciertos metabolitos y/o proteínas, que pueden ser identificados y que además proporcionan directamente una explicación de su función en el desarrollo de una enfermedad. En ese marco, la medicina de sistemas sienta las bases para expandir la comprensión personalizada de una enfermedad, puesto que permite:

- 1) La predicción mediante la recopilación de datos sobre el estado de salud del paciente, para la identificación temprana de biomarcadores, posibilitando así el diagnóstico, la intervención, la estratificación y la prevención oportuna de la enfermedad (Ma & Zhao, 2013). Lo anterior permite
- 1) Caracterizar los mecanismos patogénicos novedosos, necesarios para desarrollar modelos predictivos del inicio de la enfermedad (Nielsen, 2017b).
- 2) Seguimientos preventivos.
- 3) Mejorar el diseño de las intervenciones terapéuticas mediante la exploración sistémica de posibles interacciones fármaco-blanco.

Además de guiar el diseño y readaptación de fármacos ya existentes, promoviendo la polifarmacología al aprovechar los múltiples blancos de dichos fármacos para aumentar su eficacia terapéutica (Xu et al., 2018). Lo anterior, es una oportunidad notable en términos de recopilación y análisis de datos para la eficacia terapéutica (Greener & Sternberg, 2015).

1.5 Detección de cavidades de proteínas blanco: implicación en la identificación de sitios alostéricos y predicción de la capacidad de unión a ligandos de tipo farmacológico

Las cavidades de unión en superficies proteicas son importantes para la función de las proteínas (Gupta et al., 2018; Xu et al., 2018). Estos sitios de unión suelen estar asociados a los sitios de una proteína en los que esta, interactúa con macromoléculas biológicas (ADN, ARN y proteínas), o moléculas pequeñas, como fármacos y metabolitos (Stank et al., 2016).

La detección de estas cavidades a nivel computacional se ha considerado un paso importante para la anotación funcional de las proteínas y el diseño de fármacos basados en la estructura (Cammisa et al., 2012). Por lo tanto, se han desarrollado múltiples métodos basados en la geometría y energía (Xu et al., 2018). Además, caracterizar estos sitios de unión permite comprender principios de unión molecular (Greener & Sternberg, 2015). Lo anterior puede llevar a modelado de farmacóforos.

Según la definición dada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), un modelo de farmacóforo es "*Un conjunto de características estéricas y electrónicas que es necesario para asegurar las interacciones supramoleculares óptimas con un objetivo biológico específico y para activar (o bloquear) su respuesta biológica*" (Xu et al., 2018). Por lo que, un modelo de farmacóforo dentro de una cavidad proteica puede ser utilizado para el diseño *de novo* de nuevas moléculas candidatas y la identificación de posibles dianas farmacológicas (Nussinov & Tsai, 2013). La alostería es un proceso en el que un sitio de unión de una molécula es perturbado por un ligando, provocando además un cambio funcional o perturbación en otro sitio (regulación a distancia) (Peracchi & Mozzarelli, 2011). La alostería, puede surgir de interacciones no covalentes (p.ej., unión a algunos fármacos), interacciones covalentes (p.ej., fosforilación) y absorción de luz (Peracchi & Mozzarelli, 2011; Xu et al., 2018). Se ha demostrado que, la regulación alostérica participa en varios procesos biológicos como la señalización celular (Xu et al., 2018). Sin embargo, la mayoría de los mecanismos alostéricos siguen siendo un enigma (Stank et al., 2016).

El diseño de fármacos alostéricos es una dirección futura del descubrimiento de los mismos ya que tienen muchas ventajas en comparación con los fármacos ortostéricos tradicionalmente utilizados (aquellos que afectan solamente el sitio en el que se unen): no se unen a sitios activos que a menudo se conservan en familias de proteínas aumentando su especificidad; pueden activar como inhibir una proteína; se pueden utilizar en combinación con fármacos ortostéricos; y se ha demostrado la disminución de efectos secundarios (Xu et al., 2018). Recientemente, se ha informado que alrededor de un tercio de los medicamentos aprobados por la FDA actúan a través de mecanismos covalentes, resurgiendo el alto interés en el estudio de ligandos covalentes con alta selectividad (Stank et al., 2016; Xu et al., 2018).

La aceptación de la identificación de sitios alostéricos, la caracterización de cavidades y la predicción de unión de ligandos son objetivos de interés para el diseño de fármacos ha revolucionado la medicina sistémica de manera sin precedentes (Ayyildiz et al., 2020). Una de las principales ventajas de apuntar a sitios alostéricos es el bajo grado de conservación de secuencias que permite el diseño de moléculas de fármacos, lo cual implica la identificación de sitios distintos a la región catalítica que mostraría un alto grado de variabilidad de secuencia entre especies. Sin embargo, el descubrimiento de fármacos alostéricos aún presenta desafíos, debido a que existen: 1) proteínas “no alostéricas”, en las cuales sus sitios alostéricos se encuentran “ocultos” o no expuestos y 2) proteínas alostéricas, en las cuales existen sitios alternativos alostéricos aún no determinados (Ayyildiz et al., 2020; Stank et al., 2016). Existen varios enfoques bien establecidos para determinar los sitios alostéricos alternativos y “ocultos”. Algunos se basan en estructuras estáticas de proteínas adquiridas experimentalmente, mientras que otros se centran en el estudio de los movimientos a gran escala, como la dinámica molecular (Dilcan et al., 2019; Hornak et al., 2006). Hasta la fecha, existen diversos servidores para la detección de cavidades o “pockets” (Tabla 4).

Tabla 4. Ejemplos de servidores web recopilados relacionados con la detección de cavidades, el modelado de farmacóforos y la predicción de unión de ligandos covalentes.

Servidor	URL	Referencia
Fpocket	http://fpocket.sourceforge.net/	(Guilloux et al., 2009)
DoGSiteScorer	http://dogsite.zbh.uni-hamburg.de/1kzk#dogsite	(Volkamer et al., 2012)
POCASA	http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/service/pocasa/	(Yu et al., 2010)
GHECOM1.0	http://strcomp.protein.osaka-u.ac.jp/ghecom/	(Kawabata, 2009)
CavityPlus	http://www.pkumdl.cn:8000/cavityplus/index.php	(Xu et al., 2018)

Hasta la fecha, son pocos los intentos de implementación de estas metodologías a sistemas biológicos para dilucidar las reacciones controladoras, los mecanismos y los blancos moleculares compartidos en varias EN, sin embargo, los resultados que se han obtenido marcan un precedente de la increíble utilidad clínica y cognoscitiva de dicha unión. Por lo tanto, la presente investigación pretende emplear las metodologías asociadas a la teoría de control para identificar blancos en GEMs de astrocito humano bajo escenarios de lipotoxicidad, siendo este el momento oportuno, ya que: 1) existe un contexto socio-económico donde hay una creciente incidencia y prevalencia de EN (Nurse & Hayles, 2011); 2) la mayoría de enfermedades humanas están asociadas a cambios metabólicos, donde, en el caso de las EN la participación astrocitaria junto a la lipotoxicidad es innegable (Hidalgo-Lanussa et al., 2020; Oliveira et al., 2018); 3) la amplia cantidad de datos ómicos, habilita su integración en GEMs (Masid et al., 2020); 5) la teoría de control para la identificación de nodos controladores de un sistema permite la identificación de blancos, para la proposición de fármacos para futuras investigaciones con enfoques terapéuticos, generando nuevo conocimiento (Nielsen, 2017a). Por último, la implementación de este tipo de enfoques permite trabajar de manera ideal, acelerando el tiempo de investigación, ahorrando tiempo y recursos económicos, además de evitar problemas éticos al trabajar de manera *in silico*.

2. Pregunta de investigación

¿Cuáles son las reacciones controladoras de la respuesta de astrocitos humanos al PA en un GEM multi-ómico?

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Identificar las reacciones controladoras asociadas a la respuesta astrocitaria humana al ácido palmítico (PA) en un modelo computacional a escala genómica (GEM) multiómico que se puedan constituir como posibles blancos terapéuticos.

3.2 Objetivos específicos

- Contextualizar información ómica en un modelo metabólico a escala genómica de astrocito humano basado en información experimental con el fin de reflejar de la mejor manera posible la realidad biológica.
- Identificar los nodos controladores en los modelos metabólicos a escala genómica multiómicos de astrocito control y astrocito sometido a escenarios de lipotoxicidad.
- Identificar blancos terapéuticos asociados a los nodos controladores de la respuesta astrocitaria a escenarios de lipotoxicidad.

4. Materiales y métodos

4.1 Contextualizar información ómica en un modelo metabólico a escala genómica de astrocito humano basado en información experimental con el fin de reflejar de la mejor manera posible la realidad biológica.

La información multiómica (transcriptoma y proteoma), fue previamente generada a partir de cultivos celulares de astrocito humano en estado fisiológico, por el grupo de investigación de *Bioquímica Experimental y Computacional* de la Pontificia Universidad Javeriana (contratos con colciencias FP44842-288-2016 y FP44842-129-2017), dirigido por la Dra. Janneth González quien co-asesoró la presente tesis. La metodología de extracción de la información ómica se encuentra en la sección de anexos.

4.1.1 Anotación funcional y expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial se realizó comprobando los recuentos de registros, utilizando DESeq2 para normalizar el tamaño de la biblioteca y contraer la varianza. La expresión diferencial entre condiciones (PA frente a vehículo, PA con pretratamiento de tibolona frente a vehículo y PA con pretratamiento de tibolona frente a PA) se evaluó mediante pruebas de Wald con una corrección de Bonferroni. El análisis de enriquecimiento del acervo genético se realizó mediante Gene Ontology, WikiPathways y Reactome, utilizando 24.893 genes con al menos diez lecturas por tratamiento. La construcción de una red reguladora de genes específicos del cerebro se realizó utilizando el paquete de análisis de red reguladora transcripcional (TReNA) (rdrr.io/bioc/TReNA). Además, esta red se construyó utilizando el atlas ENCODE y datos de 278 muestras de corteza temporal post-mortem de la Clínica Mayo. TReNA enumera todos los pares de genes TF-objetivo donde hay evidencia de que el TF se une al promotor proximal y clasifica estas interacciones candidatas en función de la evidencia de coexpresión y la correlación de Spearman. Con el fin de dilucidar qué factores de transcripción ascendentes se expresan diferencialmente y

que potencialmente regulan los genes expresados, los datos obtenidos del transcriptoma y el proteoma se validaron experimentalmente y se integraron en el modelo de astrocitos de (Osorio et al., 2020a) utilizando la metodología que se describe a continuación.

4.1.2 Integración: reglas de asociación

Como fue mencionado con anterioridad, los modelos metabólicos basados en restricciones, como el GEM utilizado en este trabajo, permiten la descripción y predicción *in-silico* de posibles estados metabólicos a través de la representación matemática de reacciones metabólicas en una matriz estequiométrica (S) (Brunk et al., 2018; Orth et al., 2010). Los coeficientes estequiométricos de estas reacciones se utilizan para restringir el flujo metabólico a través del sistema (v), asegurando que se mantenga el principio de balance de masa (ecuación 4.1), de tal manera que el producto de la matriz estequiométrica S por el vector solución de flujos v sea igual a cero. El vector x representa las concentraciones de todos los metabolitos.

$$\frac{dx}{dt} = 0 \text{ or } S * v = 0 \quad (4.1)$$

En el contexto de la integración de datos multiómicos, los GEM son a su vez plataformas de análisis ideales que permiten la integración de este tipo de datos con otras capas de información biológica, como aquellas derivadas del transcriptoma y el proteoma (Aarash Bordbar et al., 2014; Pinu et al., 2019; Voillet et al., 2016).

En nuestro caso, para dicha integración de datos ómicos utilizamos el GEM de astrocito previamente publicado por nuestro grupo de investigación (Osorio et al. 2020), el cual representa 1956 metabolitos y 2747 reacciones metabólicas, asociadas a reglas de asociación Gen-Proteína-Reacción (GPR). Las GPR son una representación booleana de la asociación del gen, la transcripción y la ó las proteínas y la relación de reacción que representan explícitamente todas las relaciones entre especies moleculares y actividades funcionales en un modelo metabólico (A Bordbar & Palsson, 2011). Por lo tanto, estas reglas de asociación juegan un papel importante en la integración de datos experimentales (transcriptoma, proteoma y su relación con las reacciones) en el modelo, aumentando así la veracidad de sus predicciones (Gu et al., 2019; Karahalil, 2017; M. Kim et al., 2016).

Describir las asociaciones de GPR en un GEM trae varias ventajas para el modelado. Por ejemplo, permiten simulaciones de eliminación de genes y facilitan la integración de datos ómicos. En nuestro caso, en la reconstrucción realizada por Osorio et al. (2020) se excluyeron los números EC (Número de Comisión de Enzimas), a partir de los cuales se pueden generar asociaciones PR (Proteína-Reacción) necesarias para vincularse con los genes apropiados. Por lo tanto, en el presente trabajo realizamos también una actualización del modelo de Osorio mediante una construcción manual de estas asociaciones. Brevemente, el procedimiento seguido fue el siguiente: 1) se obtuvo la lista de genes asociados con el modelo y se buscaron las identificaciones en UniProt (<https://www.uniprot.org/uploadlists/>); 2) de la lista, se asociaron los números EC a cada una de las reacciones, utilizando la función *makeprules* (<https://github.com/gibbslab/GEM-multiomic-integrator>); 3) el mapeo de las reacciones de abundancia se realizó asociando los valores de abundancia con los identificadores de EC para cada reacción del modelo. Esto nos permitió obtener los datos de abundancia para cada escenario. Alternativamente, para mapear la expresión de datos, se realizó la siguiente metodología: 1) el ID de la reacción de Ensembl se convirtió a Entrez para mapear las expresiones; 2) las expresiones para cada reacción fueron extraídas usando la asociación GPR, usando la metodología de mapeo de expresión génica descrita a continuación (sección 4.1.4), obteniendo los datos de expresión para cada escenario.

4.1.3 Mapeo de la expresión génica y la abundancia de proteínas en las reacciones

Las reglas de asociación (GPR y PR) pueden incluir más de un gen o proteína para cada reacción. Por lo tanto, las reacciones con asociaciones múltiples incluyen reglas lógicas (AND y OR) para indicar el orden y la esencialidad de cada asociación. Estas reglas lógicas se utilizaron para mapear los valores de expresión y abundancia de las reacciones, tomando los valores mínimos cuando las asociaciones estaban unidas por AND y los valores máximos cuando era OR. COBRA Toolbox se utilizó para el mapeo de la expresión génica y la abundancia de proteínas de acuerdo a las reglas de asociación (Hyduke et al., 2011).

4.1.4 Reducción de dimensionalidad: PCA

Dado que al GEM se le debía integrar tanto datos proteómicos como datos transcriptómicos, fue necesario realizar una reducción de dimensionalidad de esta información, pues a pesar de que existen métodos que integran este tipo de datos de manera independiente, es decir un tipo de dato ómico a la vez, como parte de esta tesis consideramos necesario idear un mejor método, el cual llevará a cabo la integración de los dos tipos de datos a la vez, sobrepasando así las limitaciones de los métodos ya existentes (Wörheide et al., 2021).

La reducción de la dimensionalidad es una forma matemática de reducir la complejidad de un conjunto de datos al tiempo que aumenta el poder estadístico del análisis al reducir la carga de múltiples pruebas. Lo anterior implica la extracción de variables relevantes y la proyección de datos en el espacio de menor dimensión permitiendo la selección y extracción de características (Altenbuchinger et al., 2019; Wörheide et al., 2021; Zierer et al., 2016), lo cual se puede lograr utilizando técnicas de recuperación de información basadas en datos, como el análisis de componentes principales (PCA). En nuestro caso, el PCA se aplicó a los conjuntos de datos del transcriptoma y el proteoma, transformando las variables ómicas únicas en un subespacio de menor dimensión que maximiza la retención de la varianza dentro de los datos al encontrar combinaciones lineales ortogonales de las variables originales, guardando tanta información como sea posible. De esta forma, se puede observar el comportamiento de los datos en un conjunto más pequeño.

El PCA requiere que todas las variables sean cuantitativas y normalizadas, es decir, con media 0 y varianza 1 para cada variable, como se describe en la siguiente ecuación:

$$Z_i = \frac{x_i - \text{mean}(x)}{\sqrt{\text{Var}(x)}} \quad (4.2)$$

Basados en esta metodología, en este proyecto desarrollamos una metodología para la reducción de dimensionalidad de datos proteómicos y transcriptómicos, usando el ambiente de trabajo MATLAB. Nuestro algoritmo calcula la matriz de covarianza multiplicando la matriz de varianzas y covarianzas ($Z^t Z$), permitiendo observar el tipo de relación entre las variables. Luego, estimamos los valores de los vectores propios para crear los componentes principales definidos como $Sa = \lambda a$ donde S es la matriz de covarianza, mientras λ es el vector propio y a el valor propio. Nuestro algoritmo permite la creación de

los componentes principales no correlacionados, permitiendo que la información de las variables linealmente correlacionadas sea representada en un solo componente. Estos proporcionan la construcción de una variable biológicamente significativa estimada que representa la mayor parte de la varianza presente en los datos de transcriptoma y proteoma.

4.1.5 Construcción de un modelo multi-ómico bajo escenarios metabólicos

Para probar los efectos metabólicos de PA y de la tibolona durante la inflamación metabólica en los astrocitos, definimos tres escenarios considerando los datos del proteoma experimental y del transcriptoma obtenidos previamente: 1) un escenario "saludable"/control, que emula las condiciones metabólicas normales de los astrocitos (Das et al., 2010; Osorio, D., Botero, K., Gonzalez, J., and Pinzon, 2016; Osorio et al., 2020b); 2) Un escenario inflamatorio inducido por palmitato; 3) se definió un escenario de tratamiento con tibolona tras la inducción de inflamación por PA. Para restringir el GEM con cada uno de estos conjuntos de datos, y así obtener un modelo para cada uno de los escenarios antes mencionados, se utilizó el algoritmo *Exp2flux* (<https://github.com/gibbslab/exp2flux>), desarrollado también previamente por nuestro grupo de investigación. utilizando la información previamente obtenida por el PCA como valores para los datos de expresión requeridos por esta herramienta. Los límites del flujo de las reacciones de intercambio no se modificaron.

4.1.6 Análisis de equilibrio de flujo (FBA)

El análisis de equilibrio de flujo (FBA) es un método de optimización lineal que selecciona valores de flujo que pueden optimizar (maximizar o minimizar) una función objetivo dada (J. Huang et al., 2020; Orth et al., 2010, 2011). Las reacciones metabólicas se representan como S (matriz estequiométrica), de tamaño $m \times n$, donde m representa las concentraciones de todos los metabolitos y n las reacciones (Orth et al., 2010). Las entradas de S son coeficientes estequiométricos de los metabolitos que participan en una reacción. Hay un coeficiente positivo para cada metabolito producido y un coeficiente negativo para cada metabolito consumido. Se utiliza un coeficiente de cero para cada metabolito que no participa en una reacción particular (Osorio et al., 2020b). El flujo a través de todas las

reacciones en una red está representado por el vector v , que tiene una longitud de n (Gianchandani et al., 2010; Papin et al., 2005). El sistema de estado estacionario de ecuaciones de balance de masa se representa en la ecuación 4.1.

El FBA se puede describir a partir del siguiente sistema de ecuaciones:

$$Z = C^t J \quad (4.3)$$

$$NJ = 0 \quad (4.4)$$

$$J^{min} \leq J \leq J^{max} \quad (4.5)$$

Donde el vector C determina la relación lineal entre los valores de flujo de J , que forman la función objetivo Z . J^{min} y J^{max} son vectores de los valores mínimo y máximo, respectivamente (Maarleveld et al., 2013). El FBA para los escenarios estudiados se resolvió utilizando el paquete R “SYBIL” (Gelius-Dietrich et al., 2013).

4.1.7 Identificación de cambios en el flujo metabólico entre escenarios

Las diferencias de flujo metabólico para cada reacción entre escenarios optimizados se midieron utilizando la metodología propuesta por Osorio et al. (2020) y Osorio et al. (2016), donde la función de diferencia de flujo (*fluxDifferences*) y la función de cambio de pliegue (*foldchange*) describen cuánto cambia el flujo. La función toma como argumento dos modelos válidos y un valor umbral de $-0,5$ a $0,5$ para reacciones con cambio absoluto entre los escenarios metabólicos evaluados (Osorio et al., 2020b).

4.1.8 Identificación de reacciones esenciales

Se realizó un análisis de reacciones esenciales para identificar aquellas reacciones que eran esenciales para el crecimiento y mantenimiento de la célula astrocitaria, utilizando el principio de funcionalidad enzimática por knockout de reacciones (Jiang et al., 2015), modificando los límites superior e inferior de cada reacción convirtiéndolos en cero (Gelius-Dietrich et al., 2013). Para calcular todas las distribuciones de flujo en los modelos

restringidos que se crearon previamente, aplicamos el algoritmo de optimización IMOMA (método de minimización del ajuste metabólico). Es probable que un modelo control al que se le realiza un knockout (mutante) muestre inicialmente una distribución de flujo subóptima que sea de algún modo intermedia entre el óptimo de tipo control y el óptimo mutante. MOMA proporciona una aproximación matemáticamente manejable para este estado subóptimo intermedio, basado en la hipótesis de que el mutante permanece inicialmente lo más cerca posible del óptimo de tipo salvaje en términos de valores de flujo (Segre et al., 2002). Este algoritmo, a diferencia del FBA regular, simula todos los estados subóptimos posibles asociados con el modelo metabólico (Segre et al., 2002), según las ecuaciones 4.6, 4.7, 4.8:

$$\min(v - w)^t (v - w) \quad (4.6)$$

$$s. t. S * v = 0, \quad v_{min} \leq v \leq v_{max} \quad (4.7)$$

$$v_j = 0, \quad j \in A \quad (4.8)$$

Donde w es la distribución de flujo de tipo “salvaje” (control) y A es un conjunto de reacciones asociadas con los genes eliminados (Shlomi et al., 2005).

Aunque el análisis de la esencialidad de genes es clave para la comprensión del conjunto de genes necesarios para la supervivencia celular, todavía hay una falta de conocimiento sobre los mecanismos específicos que controlan el comportamiento celular predicho subyacente.

4.2 Identificar los nodos controladores en los modelos metabólicos a escala genómica multiómicos de astrocito control y astrocito sometido a escenarios de lipotoxicidad.

De acuerdo a lo anterior, en el modelo multiómico creado, identificamos su estructura de control al caracterizar 4 componentes clave de la red: 1) el gráfico de acoplamiento de flujo, 2) el conjunto de perfiles de acoplamiento de flujo, 3) las reacciones controladoras y 4) todos los interruptores metabólicos posibles (Basler et al., 2016).

El gráfico de acoplamiento de flujo de un modelo metabólico es un gráfico etiquetado y dirigido, que utiliza cinco perfiles de acoplamiento de flujo: completo, parcial, anti, inhibitorio y direccional, indicando el tipo de acoplamiento entre las reacciones i y j que reflejan las características funcionales de las reacciones consideradas asociadas a las vías metabólicas (Basler et al., 2016; Larhlimi et al., 2012). Entonces, usamos el gráfico de acoplamiento de flujo para calcular el gráfico de control, donde las reacciones i se convierten en nodos y se establece un borde dirigido ($i \rightarrow j$) entre los nodos de acuerdo con el perfil de flujo. Así, es posible determinar si i puede controlar el estado de j o si j puede controlar el estado de i (Basler et al., 2016). Este enfoque nos llevó a la identificación de las reacciones controladoras; el conjunto de reacciones que controlan los estados y el patrón de actividad (in)directamente de las reacciones en el modelo. Se ha determinado que las reacciones de control pueden tener un papel divergente en el modelo de control y los modelos desafiados. Por lo tanto, las diferencias en el perfil de acoplamiento entre modelos de estas reacciones se consideran interruptores metabólicos (Basler et al., 2016).

4.2.1 Control de flujos en la red multiómica de astrocitos

Siguiendo la metodología propuesta por (Basler et al., 2016), utilizamos el algoritmo Fast Flux Coupling Calculator (F2C2) dentro del entorno MATLAB (MATLAB and Statistics Toolbox Release 2021b, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, Estados Unidos) para determinar reacciones acopladas (Larhlimi et al., 2012). El algoritmo F2C2 identifica los metabolitos sin salida, bloquea las reacciones correspondientes, elimina las reacciones bloqueadas de la matriz estequiométrica y aplica la regla Trivial Full Coupling (TFC) para determinar las reacciones proporcionales entre sí. El algoritmo repite este paso hasta que no se puede identificar un metabolito sin salida y actualiza la reversibilidad de cada reacción (Larhlimi et al., 2012). Luego, F2C2 aplica las reglas Trivial Directional Coupling (TDC) y Trivial Uncoupling (TUC) para determinar reacciones (des)acopladas y determinar el flujo de acoplamiento entre reacciones (pseudo-)irreversibles usando programación lineal (LP) (David et al., 2011; Larhlimi et al., 2012). Restringimos el conjunto de distribuciones de flujo factibles y definimos anti-acoplamiento de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$F\{v \in R^n \mid S v = 0, lb \leq v \leq ub, \exists i \in E: v_i \neq 0\} \quad (4.9)$$

Donde n es el número de reacciones, matriz S , ub , lb son los límites superior e inferior, y E es el conjunto de reacciones de intercambio. El análisis de variabilidad de flujo (FVA) y la programación lineal entera mixta (MILP) se utilizan para determinar las reacciones acopladas o antiacopladas.

El perfil de acoplamiento de flujo de una red está determinado por un vector $v \in R^n$ que representa las frecuencias de los cinco tipos de acoplamiento dados por el tipo de flujo de cada reacción (R) (acoplamiento direccional, parcial, anti, inhibitorio y completo). Dado que estos perfiles de acoplamiento de flujo pueden reflejar características funcionales importantes para el metabolismo de la célula astrocitaria (Basler et al., 2012, 2016; Basler & Nikoloski, 2011), aplicamos tres algoritmos de agrupamiento (jerárquico, k-medias y k-medoids) basado en las distancias euclidianas sobre los perfiles de acoplamiento de flujo en las tres redes analizadas. Los conglomerados obtenidos en cada instancia se evaluaron mediante un algoritmo PCA y principio de distancia a través de los índices de Silhouette, Calinski-Harbasz y Davies-Bouldin. Esto se hizo siguiendo la metodología propuesta por (Basler et al., 2016). Es importante resaltar el enfoque de agrupamiento para los espectros acumulativos de valores singulares normalizados en la red. Los espectros acumulativos de valores singulares, permiten el agrupamiento de los perfiles de acoplamiento de flujo, teniendo en cuenta la importancia de la compartimentalización del modelo. Esos valores singulares están dados por la estructura de la matriz estequiométrica, y se usan para calcular la dimensionalidad y la cantidad de componentes del modelo necesarios para dar cuenta de un porcentaje determinado de su estructura. Por lo tanto, lo anterior permite determinar si el agrupamiento de perfiles de acoplamiento de flujo basados en los cinco acoplamientos es una consecuencia de determinantes estructurales (Duarte et al., 2007). Los valores singulares de una matriz S vienen dados por los valores de entrada de la diagonal D obtenidos por descomposición (Basler et al., 2016; Duarte et al., 2007):

$$S = UDV \tag{4.10}$$

La prueba de hipótesis se realizó de acuerdo a las restricciones de la red con base en el principio del balance de masa, a través de la metodología de aleatorización con reemplazo de sustratos y productos de la red, cambiando los coeficientes estequiométricos conservando el balance de masa propuesto por (Basler & Nikoloski, 2011) y (Basler et al., 2012).

4.2.2 Muestreo de patrones de actividad de reacción y gráfico de acoplamiento de flujo

El muestreo de los patrones de actividad de la reacción se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por (Basler et al., 2016), utilizando muestreo aleatorio de distribuciones de flujo en estado estacionario, asegurando valores distintos de cero. Se realizó un gráfico de acoplamiento de flujo etiquetado de la red metabólica:

$$G = (V, E) \quad (4.11)$$

Donde V es el conjunto de todas las reacciones no esenciales desbloqueadas en la red, y dos vértices i y j están conectados por un nodo $(i, j) \in E$. Se realizan cinco etiquetas (completa, parcial, direccional, anti, e inhibitoria), indicando si i se acopla j o j se acopla con i el tipo de acoplamiento correspondiente (Basler et al., 2016a).

4.2.3 Gráfico de control y cálculo de reacciones de control

Con respecto al gráfico de control para una red con n reacciones, se analizó un patrón de actividad de reacción para especificar reacciones activas e inactivas. De acuerdo con la metodología propuesta por (Basler et al., 2016), se debe generar un gráfico de control que contenga un vértice para cada reacción i y una conexión si i y j están acoplados. Lo anterior viene especificado por la matriz de adyacencia M , donde $M_{i,j} = 1$, si se cumple alguna de las siguientes condiciones (Basler et al., 2016):

1. $\sigma_i = \sigma_j = 1$ y $L(i, j) \in \{Total, parcial, direccional\}$, o
2. $\sigma_i = 0, \sigma_j = 1$ y $L(i, j) = anti$, o
3. $\sigma_i = 1, \sigma_j = 0$ y $L(i, j) \in \{inhibitorio\}$, o
4. $\sigma_i = \sigma_j = 0$ y $L(i, j) \in \{total, parcial\}$, o
5. $\sigma_i = \sigma_j = 0$ y $L(i, j) = direccional$,

y $M_{i,j} = 0$ de lo contrario.

Por lo tanto, el cálculo de las reacciones de control viene dado por un conjunto menor de reacciones (reacciones intermitentes, críticas y redundantes), cuyas actividades deben especificarse para activar todas las reacciones dado el valor de σ . Para el cálculo del patrón de actividad se siguió la metodología propuesta por (Basler et al., 2016). El procedimiento general utilizado para calcular estas reacciones de control se implementó en un nodo computacional dedicado que utiliza 72 núcleos de CPU *Intel Xeon Gold 6240* a 2,60 GHz y 512 GB de RAM.

4.3 Identificar blancos terapéuticos asociados a los nodos controladores de la respuesta astrocitaria a escenarios de lipotoxicidad.

Análisis de estructural

4.3.1 Obtención de estructura terciaria y ligandos asociados

Las estructuras terciarias de las proteínas involucradas en las RC fueron obtenidas de la base de datos PDB (del inglés, Protein Data Bank) (Burley et al., 2021). Se consideró toda estructura experimental que cumplió con las siguientes características: (1) 80% de cobertura de su proteína respectiva, (2) alta calidad ($< 2.6 \text{ \AA}$), y (3) sin fragmentaciones. La estructura terciaria de las proteínas sin una estructura experimental adecuada fue obtenida por modelamiento teórico utilizando la base de datos AlphaFold (Ronneberger et al., 2021) o, en su defecto, mediante modelado por homología en el servidor Swiss-Model (Waterhouse et al., 2018).

Los ligandos y sus sitios de unión correspondientes fueron obtenidos de complejos co-cristalizados reportados en el PDB. Las proteínas sin ligandos co-cristalizados fueron analizadas en el servidor COACH-D (Wu et al., 2018), en donde ligandos potenciales son predichos mediante métodos basados en estructura o plantilla, y sus sitios de unión correspondientes son verificados mediante docking molecular con AutoDock Vina (Trott, O. and Olson, 2011).

4.3.2 Caracterización de cavidades con potencial drogable

Las cavidades asociadas al sitio de unión del ligando se predijeron con la herramienta Cavity del servidor CavityPlus, utilizando la opción "With Ligand" (Xu et al., 2018). Adicionalmente, las cavidades reguladas alostéricamente por los sitios de unión del ligando, se predijeron utilizando la opción "No Ligand" de la herramienta Cavity, y la herramienta CorrSite2.0, ambas del mismo servidor (Xu et al., 2018). En este análisis, una cavidad regulada alostéricamente corresponde a cualquier cavidad con un valor CorrSite superior a 0,5 respecto a la cavidad que contiene el sitio de unión al ligando.

El potencial drogable de las cavidades identificadas se caracterizó mediante los índices de ligandabilidad (Pred. Max pKd) y drogabilidad (DrugScore) obtenidos en la predicción de cavidades. Cualquier cavidad con un Pred. Max pKd > 6,0 y un DrugScore de druggabilidad media o fuerte se consideraron cavidades con potencial drogable.

Finalmente, la visualización de las estructuras de proteínas y ligandos, así como de las cavidades identificadas, fue realizada en el sistema de gráficos moleculares PyMOL, versión 2.5 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5 Schrödinger, LLC.) (Schrödinger, 2015).

5. Resultados y Discusión

5.1 Redes contexto-específicas de astrocitos

Presentamos tres modelos multiómicos contexto-específicos que son una compilación de 2747 reacciones bioquímicas, de las cuales 1607 pertenecen a reacciones intracelulares, 60 corresponden a reacciones que permiten la entrada y salida de metabolitos del medio ambiente a la célula (reacciones de intercambio), y 1080 son reacciones de transporte, que permiten el transporte de metabolitos entre compartimentos celulares. Para modelar los efectos lipotóxicos del ácido palmítico y el efecto protector de la tibolona a nivel metabólico en astrocitos, realizamos una optimización del modelo bajo tres escenarios metabólicos diferentes, obteniendo un fenotipo metabólico para cada escenario (Figura 5).

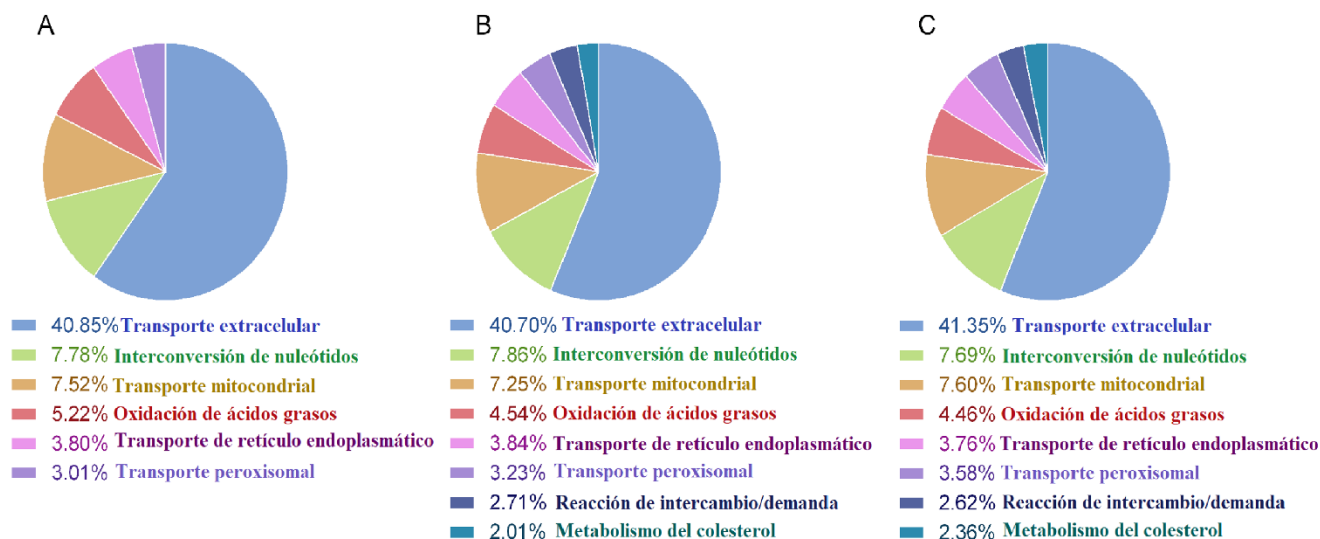


Figura 5. Distribución de reacciones por subsistemas asociados al fenotipo metabólico para cada modelo metabólico generado. Se muestran los principales subsistemas activados. (A) Fenotipo metabólico para el modelo control, en el que se activaron el 41,17% de las reacciones; (B) Fenotipo metabólico para el modelo de palmitato, en el que se activaron el 41,68% de las reacciones; (C) Fenotipo metabólico para el modelo tibolona-palmitato, en el que se activaron el 41,65% de las reacciones.

La simulación metabólica predice una tasa de crecimiento astrocitaria de $0,447430 \text{ mMgWD}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en condiciones normales (medio ABM suplementado), con una activación del 41,17 % de las reacciones del modelo, lo que sugiere una preferencia por un metabolismo basado

en energía, especialmente de glucosa y ácidos grasos (Figura 5A). Este metabolismo energético se observó dentro del subsistema de transporte extracelular, donde los metabolitos obtenidos se asocian al catabolismo de glucosa y ácidos grasos. Además, nuestro modelo también sugiere un metabolismo energético basado en la oxidación de ácidos grasos, lo cual es consistente con los resultados obtenidos por (Osorio et al., 2020a). La tasa de liberación de metabolitos y el crecimiento de la biomasa se utilizaron como referencia para comparar los cambios entre los tres escenarios metabólicos.

5.2 Escenario inflamatorio

En este escenario, utilizamos información experimental en la que las células se cultivaron en un microambiente con una mayor concentración de PA. El crecimiento calculado en esta simulación fue de $0,472459 \text{ mMgWD}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Nuestro modelo mostró una activación del 41,68 % de las reacciones del modelo (Figura 5B), aumentando la captación de L-asparagina, L-arginina, L-ascorbato, L-carnitina, L-serina, D-glucosa y L-glutamato. Estos resultados también son consistentes con los resultados obtenidos por (Osorio et al., 2020a) (Figura 6). Esta respuesta es habitual en astrocitos bajo agresiones, donde la inflamación genera alteraciones homeostáticas (Bylicky et al., 2018; Hidalgo-Lanussa et al., 2020).

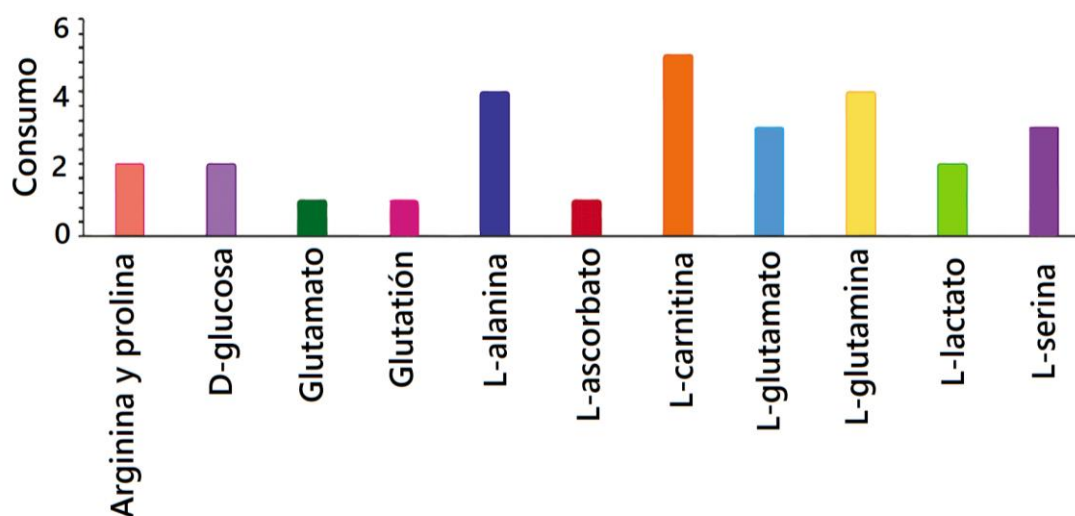


Figura 6. Resumen de consumo de metabolitos. Tasa de absorción de metabolitos en el escenario inflamatorio utilizando la reacción de biomasa genérica incluida en el modelo multiómico como función objetivo.

Una disminución de arginina se ha asociado con la inflamación y el estrés oxidativo. Su reducción es un biomarcador de inflamación metabólica durante procesos de obesidad, mostrando una proporcionalidad inversa entre la concentración de arginina y IL-6, CRP y TNF- α en suero (Niu et al., 2012). Por lo tanto, el aumento previsto de la captación de arginina podría estar relacionado con un mecanismo antiinflamatorio activado en los astrocitos bajo tratamiento con PA (Moncada, S. & Higgs, 1993). Al igual que la glutamina, las concentraciones crecientes de L-asparagina han mostrado un aumento del pH en los astrocitos, prediciendo una activación del mecanismo de transporte de intercambio de H (Chaudhry et al., 1999, 2001) Además, la asparagina induce una respuesta de Ca²⁺ comparable a los estados de Ca²⁺ inducidos por GABA (Doengi et al., 2009; Osorio et al., 2020a; Schousboe et al., 2013). Por lo tanto, esta captación de asparagina podría ser un mecanismo de retroalimentación para controlar la captación de glutamina que probablemente aumentaría en el medio extracelular, como predice nuestro modelo (Chaudhry et al., 2001). Además, la L-carnitina actúa en la degradación de los ácidos grasos por β -oxidación, representando un biomarcador neuroprotector, que lleva a las células a reducir el estrés oxidativo y mejorar su metabolismo energético (aumentando el catabolismo y la liberación de lactato y glucosa) (Agostinho et al., 2010; Pardo et al., 2013; Schousboe et al., 2013). Por otro lado, se ha informado que el ascorbato tiene un efecto antiinflamatorio en cocultivos de neuronas/glia al inhibir p38, la señalización de ERK MAPK y la translocación de NF- κ B (Y. N. Huang et al., 2014).

Nuestras simulaciones también sugieren que las células astrocitarias pueden aumentar la absorción de glutamato en condiciones inflamatorias. Aunque los astrocitos previenen altas concentraciones de glutamato y mantienen la homeostasis metabólica de los aminoácidos al convertir el glutamato en glutamina para su absorción neuronal (Flott & Seifert, 1991; Haroon et al., 2017; Mahmoud et al., 2019), una alta concentración de glutamato contribuye a la excitotoxicidad y a la activación crónica (astrocitos reactiva) (Haroon et al., 2017; Y. N. Huang et al., 2014; Mahmoud et al., 2019). Los mecanismos de supervivencia de los astrocitos se han asociado con una mayor captación de L-serina, descritos por autores como (Wong et al., 2014b) y (Osorio et al., 2020a). En otras palabras, todos los intercambios de metabolitos que se obtuvieron diferencialmente en el escenario inflamatorio por nuestro modelo mostraron un papel esencial en la homeostasis, que se esperaba debido a la función conocida en los astrocitos.

En el escenario inflamatorio, el fenotipo metabólico activa 1145 reacciones donde 535 mostraron una alta variabilidad de flujo con respecto al control (activación, inactivación o cambio de flujo), afectando la oxidación de ácidos grasos (11,21%), transporte extracelular (35,14%), transporte mitocondrial (8,22%), la interconversión de nucleótidos (6,36 %), el transporte del retículo endoplásmico (3,36 %), la síntesis de queratán sulfato (2,06 %) y el ciclo del ácido cítrico (2,06 %). Estos resultados también son consistentes con los hallazgos de (Osorio et al., 2020a), quienes sugirieron que los astrocitos modificaron la velocidad de flujo de 586 reacciones en comparación con el escenario no estimulado. En este sentido, es importante resaltar que (Osorio et al., 2020a) realizaron un análisis de sensibilidad para identificar reacciones proinflamatorias, que al inhibirlas mejoraban el metabolismo celular de los astrocitos. Las dos reacciones candidatas se asociaron con formidoiltransferasa ciclodeaminasa (FTCD) y transporte de agua mitocondrial, asociado con acuaporina-9. El papel de la FTCD en las dietas ricas en grasas, así como en la degradación de la reserva de folato, la síntesis de glutamato y el rendimiento de la memoria en adultos jóvenes se ha descrito previamente (Osorio et al., 2020a). Vale la pena notar que consistentemente en este trabajo predecimos esta misma activación, sin embargo, se necesitan más análisis para establecer el papel exacto de FTCD en el contexto de la neuroinflamación.

Nuestros resultados también predijeron la activación de reacciones adicionales relacionadas con el subsistema de sulfato de queratán (Tabla 5). En respuesta a la lesión, los astrocitos reactivos conducen a la formación de una cicatriz (cicatriz glial) mediante la regulación positiva de proteoglicanos de sulfato y proteoglicanos de queratán sulfato (KSPG) para inhibir el crecimiento axonal de las neuronas lesionadas (Dupuis et al., 2019; Hilton et al., 2012; K. Li et al., 2019; X. Li et al., 2020; Patil et al., 2007; Verkhatsky & Butt, 2018). Recientemente se ha determinado que la regulación a la baja de la N-acetilglucosamina 6-O-sulfotransferasa (GlcNAc6ST) involucrada en la vía del queratán sulfato en el sistema nervioso central, conduce a la pérdida de queratán sulfato reactivo, lo que provoca una reducción de la cicatriz glial, formada después de una lesión (Ito et al., 2010; H. Zhang, Muramatsu, et al., 2006; H. Zhang, Uchimura, et al., 2006). Por lo tanto, existe consistencia entre las predicciones de nuestro modelo y el subsistema de queratán sulfato como reacciones clave durante la inflamación de los astrocitos, cuya variación posiblemente mejoraría el metabolismo de los astrocitos durante un escenario lipotóxico.

Tabla 5. Conjunto de reacciones reguladas a la baja del metabolismo del sulfato de queratán después del tratamiento con PA.

IDENTIFICACIÓN	SUBSISTEMA	REACCIÓN DE FÓRMULA	DESCRIPCIÓN
AG13T13G	Síntesis de queratán sulfato	$uacgam [g] + ksi_pre27[g] \rightarrow h[g] + udp [g] + ksi_pre28[g]$	N – acetilactosaminida beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa, aparato de Golgi
AG13T14G	Síntesis de queratán sulfato	$uacgam [g] + ksi_pre30[g] \rightarrow h[g] + udp [g] + ksi_pre31[g]$	N – acetilactosaminida beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa, aparato de Golgi
AG13T15G	Síntesis de queratán sulfato	$uacgam [g] + ksi_pre33[g] \rightarrow h[g] + udp [g] + ksi_pre34[g]$	N – acetilactosaminida beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa, aparato de Golgi
FUCASE2E	Degradación de queratán sulfato	$h2o[e] + ksi [e] \rightarrow fuc_L [e] + ksi_deg1[e]$	alfa -fucosidasa , extracelular
G14T14G	Síntesis de queratán sulfato	$udpgal [g] + ksi_pre26[g] \rightarrow h[g] + udp [g] + ksi_pre27[g]$	beta-N-acetilglucosaminilglucopéptido beta-1,4-galactosiltransferasa, Golgi
G14T15G	Síntesis de queratán sulfato	$udpgal [g] + ksi_pre29[g] \rightarrow h[g] + udp [g] + ksi_pre30[g]$	beta-N-acetilglucosaminilglucopéptido beta-1,4-galactosiltransferasa, Golgi
G14T16G	Síntesis de queratán sulfato	$udpgal [g] + ksi_pre32[g] \rightarrow h[g] + udp [g] + ksi_pre33[g]$	beta-N-acetilglucosaminilglucopéptido beta-1,4-galactosiltransferasa, Golgi

G14T17G	Síntesis de queratán sulfato	udpgal [g] + ksi_pre35[g] - > h[g] + udp [g] + ksi_pre36[g]	beta-N-acetilglucosaminilglucopéptido beta-1,4-galactosiltransferasa, Golgi
S6T12G	Síntesis de queratán sulfato	ksi_pre28[g] + paps [g] - > h[g] + ksi_pre29[g] + pap[g]	galactosa/N - acetilglucosamina 6-O-sulfotransferasa, aparato de Golgi
S6T13G	Síntesis de queratán sulfato	ksi_pre31[g] + paps [g] - > h[g] + ksi_pre32[g] + pap[g]	galactosa/N - acetilglucosamina 6-O-sulfotransferasa, aparato de Golgi
S6T14G	Síntesis de queratán sulfato	ksi_pre34[g] + paps [g] - > h[g] + ksi_pre35[g] + pap[g]	galactosa/N - acetilglucosamina 6-O-sulfotransferasa, aparato de Golgi

Se realizó un análisis de esencialidad para determinar cuáles de las 535 reacciones que variaron durante la inflamación eran vitales para la supervivencia celular. Identificamos 136 reacciones esenciales que pueden estar asociadas con procesos proinflamatorios. La mayoría de las reacciones correspondieron al transporte extracelular (27,12%), transporte al retículo endoplásmico (10,17%), oxidación de ácidos grasos (25,42%) y metabolismo de folatos (3,39%). Dentro de estas reacciones, PA generó la activación de 59 reacciones (Figura 7A). Algunas de ellas son reacciones de transporte extracelular asociadas con la captación de L-arginina, L-alanina, L-asparagina, L-treonina, L-metionina, L-iso-leucina, L-fenilalanina, L-valina y L-histidina. Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado previamente que muchos de estos metabolitos participan en la respuesta inflamatoria. El aumento de la captación de histidina se asocia con la captación de radicales libres, y se relacionan negativamente junto con treonina, glicina, lisina y serina con la secreción de IL-6, TNF- α , PCR e IL-8 (Niu et al., 2012; Son et al., 2005). Por lo tanto, estas reacciones esenciales identificadas tienen una importancia demostrada experimentalmente en la inflamación, siendo cruciales para el mantenimiento de la homeostasis.

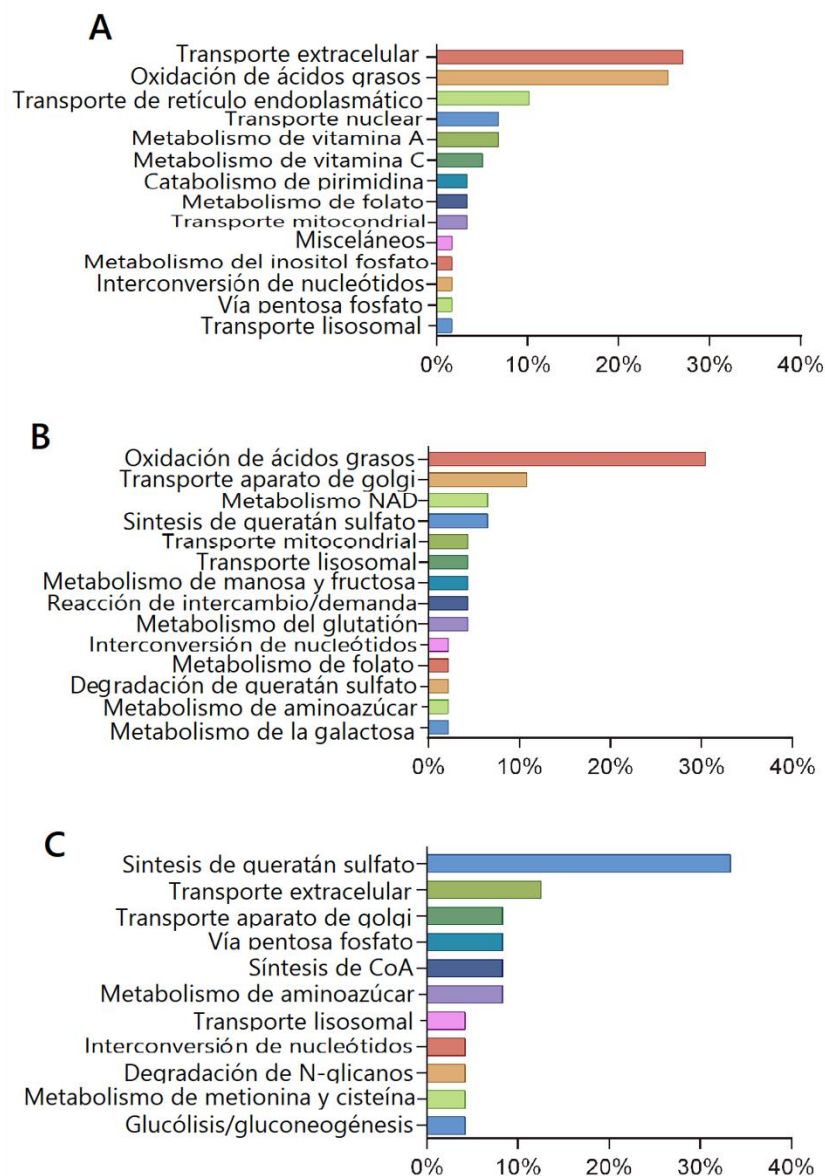


Figura 7. Resumen de vías asociadas a reacciones bioquímicas que presentaron alta variabilidad de flujo en comparación con palmitato. (A) Reacciones activadas por tratamiento con palmitato; (B) Reacciones principales inactivadas por tratamiento con palmitato; (C) Reacciones con flujo metabólico disminuido por tratamiento con palmitato.

Las simulaciones del escenario PA generaron la inactivación de 46 reacciones. La mayoría de estas reacciones están asociadas con: transporte del aparato de Golgi (10,87 %), metabolismo de monosacáridos (2,17 %), metabolismo de folatos (2,17 %) (Tabla 6) y degradación de queratán sulfato (2,17 %) (Figura 7B). El metabolismo del folato respalda el metabolismo del carbono, que activa y transfiere unidades de carbono para procesos biosintéticos (Souders et al., 2021).

Tabla 6. Conjunto de reacciones del metabolismo del folato con potencial inflamatorio y alteraciones, identificadas a través de un análisis de esencialidad y variabilidad en el escenario inflamatorio con palmitato.

IDENTIFICACIÓN	SUBSISTEMA	DESCRIPCIÓN	FLUJO V *	FLUJO P. *	DOBLARCAMBIAR
FOLR2	Metabolismo del folato	Folato reductasa (metilentetrahydrofolato reductasa)	0	0,63	0,63
R0226	Metabolismo del folato	5,6,7,8-tetrahydrofolato: NADP+ oxidoreductasa Una reserva de carbono por folato/biosíntesis de folato EC:1.5.1.3	2,78E-17	0	-1
MTHFD2M	Metabolismo del folato	metilentetrahydrofolato deshidrogenasa (NAD)	-1,79	1,72	-1,96
MTHFDM	Metabolismo del folato	metilentetrahydrofolato deshidrogenasa (NADP)	1,65	-1,88	-2,13

*Flujos para escenario "control" (V.Flux) y escenario inflamatorio (P.Flux)

En los astrocitos, tanto la disminución de la serina como del tetrahydrofolato (THF) inducen estrés astrocitario, reduciendo la síntesis de NADPH debido a la deficiencia de NAD (Balsa et al., 2020; Rose et al., 2020). Cuando se pierde la ruta del folato mitocondrial, la direccionalidad del flujo de carbono citosólico se invierte para compensar la síntesis de NADPH (Field et al., 2014; Rose et al., 2020). La metilentetrahydrofolato deshidrogenasa (MTHFD) en tejidos sanos o normales del sistema nervioso central es baja o incluso inexistente. Sin embargo, la expresión de MTHFD en estados patológicos aumenta y genera una disminución en la disponibilidad de metiltetrahydrofolato, creando una alta demanda por parte de los donantes de grupos metilo para la formación de metionina (Coppedè, 2021; Coppedè et al., 2006; Shi et al., 2021). Este mecanismo afecta la comunicación y señalización neuronal y los procesos antioxidantes que respaldan la función mitocondrial en las células (Coppedè et al., 2006; Field et al., 2014; Rose et al., 2020). Como se indicó

anteriormente, nuestro modelo identificó el metabolismo del folato como un conjunto de reacciones esenciales, y la inactivación de algunas de ellas exhibe el estrés producido por PA en el metabolismo astrocítico. Por otro lado, 24 reacciones disminuyeron el flujo metabólico, entre las cuales la mayoría son de síntesis de queratán sulfato (33,33%), transporte extracelular (12,5%), metabolismo de monosacáridos (8,33%) y síntesis de CoA (8,33%) (Figura 7C). Como se mencionó anteriormente, las alteraciones en el metabolismo asociadas a estos subsistemas están asociadas a procesos proinflamatorios. Según nuestro modelo, la vía del queratán sulfato se detectó en el análisis de esencialidad, al inhibirse su degradación, se reduce su síntesis y se observa una alta variabilidad en este subsistema. Nuestros hallazgos resaltan la importancia que puede tener el queratán sulfato en la respuesta astrocitaria al PA, lo que lo convierte en un objetivo potencial para futuros estudios.

5.3 Escenario de tratamiento con tibolona-PA

En el escenario de tratamiento con tibolona, las simulaciones mostraron un crecimiento celular de $0,605193 \text{ mMgWD}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Después del tratamiento con tibolona *in silico*, el modelo activó el 41,65% de las reacciones bioquímicas (Figura 5C). Al contrastar el modelo de palmitato contra el modelo de tibolona, la tibolona generó una variación de flujo en 747 reacciones. Encontramos importantes cambios metabólicos asociados a la activación, inactivación o cambio de flujo de vías protectoras en astrocitos, lo que concuerda con la simulación realizada por (Osorio et al., 2020a). En este escenario se encontraron 374 reacciones esenciales cuya variabilidad puede estar asociada a procesos inflamatorios o protectores. Dentro de estas reacciones, la mayoría se están contempladas en la oxidación de ácidos grasos (21,93%), degradación de queratán sulfato (12,03%), síntesis de queratán sulfato (9,63%), transporte extracelular (7,22%), transporte mitocondrial (3,74%) y síntesis de condroitina (3,74%). De estas reacciones, 17 se activaron (Figura 8A) y 60 aumentaron su valor de flujo (Figura 8B) bajo el tratamiento con tibolona. Entre estas 60 reacciones, los sistemas biológicos más representativos son la oxidación de ácidos grasos (28,33%), la síntesis de queratán sulfato (28,33%) y el transporte extracelular (8,33%).

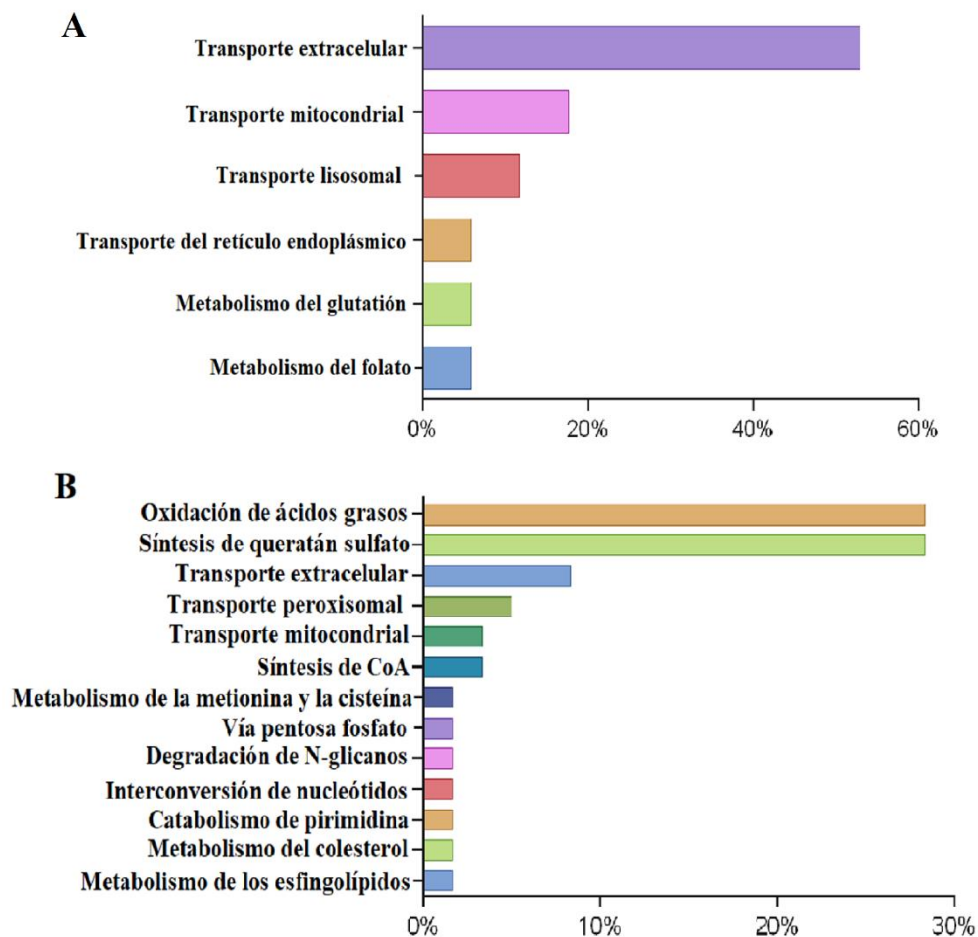


Figura 8. Resumen de vías asociadas a reacciones bioquímicas que presentaron alta variabilidad de flujo en comparación con tibolona. Se calculó el porcentaje de activación, inactivación y disminución o aumento del valor del caudal frente a los escenarios. (A) Reacciones activadas por tratamiento con tibolona. (B) Reacciones que aumentan el flujo metabólico del tratamiento con tibolona.

Bajo el tratamiento con tibolona, se muestra que la síntesis de queratán sulfato aumenta, lo que probablemente permite que se formen cicatrices gliales al activar la glía, la microglía y los oligodendrocitos (Tabla suplementaria 1) (Jones & Tuszynski, 2002; Rose et al., 2020; H. Zhang, Muramatsu, et al., 2006; H. Zhang, Uchimura, et al., 2006). Se ha demostrado que la astrogliosis reactiva es beneficiosa para la protección neuronal y la regulación de la inflamación en múltiples afecciones (Sofroniew M. V., 2009). Sin embargo, nuestro modelo encontró la inactivación de reacciones asociadas con N-acetilglucosamina 6-O-sulfotransferasa-1, una enzima relacionada con la síntesis de queratán sulfato (H. Zhang, Muramatsu, et al., 2006). Es posible que el pretratamiento con tibolona esté activando un

mecanismo protector en los astrocitos para compensar el efecto lipotóxico del AP y que además, es una activación muy controlada, similar a la esperada en un escenario protector (Sofroniew M. V., 2009).

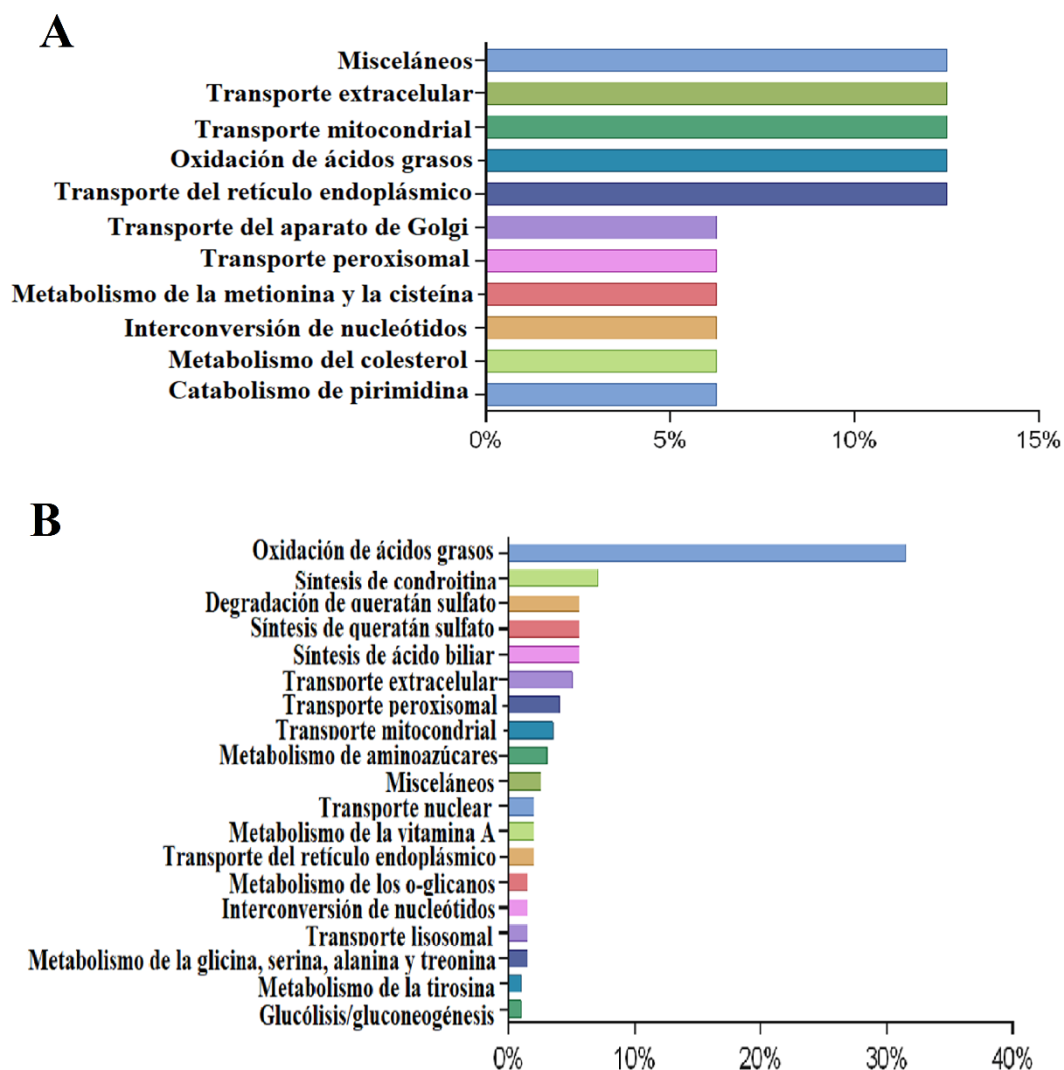


Figura 9. Resumen de vías asociadas a reacciones bioquímicas que presentaron alta variabilidad de flujo en comparación con tibolona. (A) Reacciones que disminuyen el flujo metabólico del tratamiento con tibolona. (B) Reacciones que se inactivan mediante el tratamiento con tibolona.

Además, este escenario mostró la inactivación de 197 reacciones (Figura 9B) y la disminución del flujo de 16 reacciones (Figura 9A), que corresponden a la oxidación de ácidos grasos (31,47 %), la síntesis de condroitina (7,11 %) y la degradación de sulfato de

queratán (5,58%), entre otros. Al igual que con los resultados obtenidos por (Osorio et al., 2020a), se encontró que la tasa de absorción y liberación de L-glutamina y L-glutamato mediada por tibolona se redujo, lo que se asocia con efectos neuroprotectores (Flott & Seifert, 1991). Además, como se mencionó anteriormente, la tibolona podría afectar positivamente las vías protectoras al inhibir la degradación del queratán, lo que permitiría un posible aumento de la viabilidad celular al proteger la homeostasis celular. Estos resultados sugieren que la tibolona ejerce una modulación significativa sobre las reacciones inflamatorias mediante la activación de vías protectoras. Asimismo, genera la desactivación de vías neuroinflamatorias, lo que concuerda con resultados experimentales (Á & Park, 2003; Ávila et al., 2014; González-giraldo et al., 2019; Hidalgo-Ianussa et al., 2017; Martín-Jiménez et al., 2017).

5.4 Las reacciones controladoras en un modelo multiómico de astrocitos se obtienen mediante patrones de actividad de reacción y gráficos de acoplamiento de flujo

Los resultados anteriores nos permitieron tener una visión global de las posibles reacciones objetivo según nuestros modelos. Usamos la teoría de control que combina la eficiencia de los métodos realizados previamente con la amplitud de los enfoques imparciales al no usar funciones objetivo y, por lo tanto, permite estudios metabólicos sistemáticos. Según la teoría de control y el principio de estado estacionario, las reacciones operan a través de relaciones de acoplamiento y el estado de las reacciones, de los cuales, autores como (McCloskey et al., 2013), (Burgard et al., 2004) y (Basler et al., 2016) han propuesto cinco relaciones de acoplamiento de flujo: direccional, parcial, completa, inhibidora y antiacoplamiento. El acoplamiento implica que los flujos pueden controlarse regulando las actividades enzimáticas, las concentraciones y el principio de estado estacionario, lo que sugiere que la relación gen-proteína-reacción debe coordinarse de acuerdo con su estado impuesto (Basler et al., 2016; Schuetz et al., 2007).

Para determinar si el acoplamiento de flujo refleja los principios funcionales del metabolismo del modelo de astrocito, analizamos los tres modelos estudiados previamente (control, lipotóxico y tibolona). Para cada modelo, primero calculamos los cinco tipos de

acoplamiento y sus frecuencias de acuerdo con el perfil de enlace de flujo para cada modelo (Figura 10A, B). Encontramos que los perfiles de acoplamiento para las tres redes son similares. Sin embargo, las reacciones que participan en cada modelo varían de acuerdo con las características metabólicas de cada escenario, lo cual es consistente con el análisis anterior. De acuerdo con los resultados obtenidos por (Basler et al., 2016), rara vez se encuentra antiacoplamiento en este tipo de modelos, por lo que las frecuencias de antiacoplamiento encontradas (< 0.1) para nuestras redes multiómicas son consistentes con sus resultados.

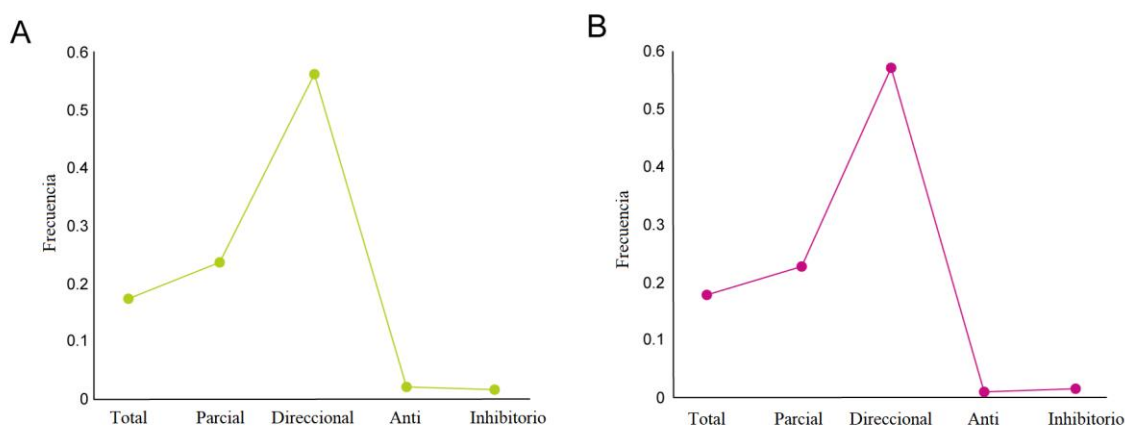


Figura 10. Agrupación de perfiles de acoplamiento de flujo. Utilizamos tres métodos de agrupamiento: jerárquico, k-means y kmedoids para la clasificación del perfil de acoplamiento. (A) Perfiles de acoplamiento de flujo del modelo multiómico "saludable" de astrocito; (B) Perfiles de acoplamiento de flujo del modelo multiómico lipotóxico de astrocito.

Considerando las cinco relaciones de acoplamiento, aplicamos la metodología utilizada por (Basler et al., 2016), en el que se consideran los patrones de actividad, a través de un gráfico de control. El gráfico de control indica qué reacciones controlan el estado de otras reacciones para el patrón de actividad considerando el esquema de muestreo descrito y calculando el promedio de las reacciones del conductor sobre 1000 patrones de actividad (Basler et al., 2016; Terzer & Stelling, 2008). Por lo tanto, determinamos que la fracción de reacciones que son controladoras del metabolismo central para el modelo de astrocitos es de aproximadamente 41,95 %. Esto es consistente con las fracciones que van del 35,8% al 49,2% para los eucariotas (Basler et al. 2016). Es importante resaltar que la mayoría de las reacciones encontradas son parte del metabolismo central, controlando indirectamente las

reacciones del metabolismo secundario, como se observó en nuestros análisis previos. También es importante resaltar que este es un proceso que consume tiempo y recursos informáticos. En nuestro caso, para una red de este tamaño y con los recursos de hardware descritos en la sección Métodos, este análisis nos tomó dos semanas de recursos informáticos para completarse.

5.5 Reacciones controladoras en un modelo de astrocitos multiómicos en un escenario lipotóxico

Como se describió anteriormente, el aumento de la captación de L-serina, D-glucosa, L-glutamato y la liberación de L-glutamina y lactato es una respuesta habitual a la respuesta inflamatoria. Así como la activación y desactivación de vías metabólicas asociadas a la inflamación y al estrés oxidativo. Sin embargo, sigue siendo un desafío identificar la relación de genes y enzimas que sirven como posibles factores de activación de la lesión astrocitaria en un escenario lipotóxico y su modulación con tibolona. Por lo tanto, analizamos las asociaciones gen-enzima-reacción clasificando los nodos controladores según sus roles en cada escenario del modelo (Devkota & Wuchty, 2020), agrupándolos en tres clases según el número de patrones de actividad (crítico, redundante, y reacciones intermitentes) (Basler et al. 2016) (Figura 11). Para los tres modelos evaluados, encontramos 84 reacciones críticas asociadas con el metabolismo central: metabolismo de carbohidratos (es decir, glucólisis, gluconeogénesis), vías de pentosa fosfato, ciclo de ácido tricarboxílico, biosíntesis de aminoácidos y vías de intercambio de aminoácidos (Tabla suplementaria 2).

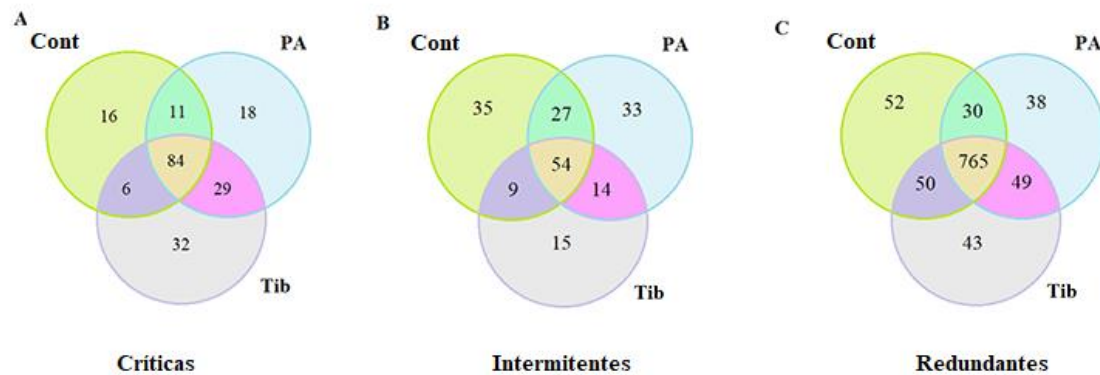


Figura 11. Diagrama de Venn que muestra el número de reacciones asociadas en cada modelo con reacciones redundantes, intermitentes y críticas, y sus intersecciones.

Para identificar los patrones de control de flujo que subyacen a los cambios saludables en el metabolismo de las células astrocitarias, identificamos reacciones controladoras críticas en el modelo de ácido palmítico, que son redundantes o intermitentes en el modelo de control. Nos referimos a estas reacciones como interruptores metabólicos debido a su papel divergente en el control del efecto lipotóxico en la célula astrocitaria pero no en el metabolismo saludable. En total, se encontraron 25 cambios metabólicos, donde el perfil de acoplamiento difiere entre los modelos de control y AP, principalmente en los acoplamientos direccionales, inhibitorios y parciales (Figura 12).

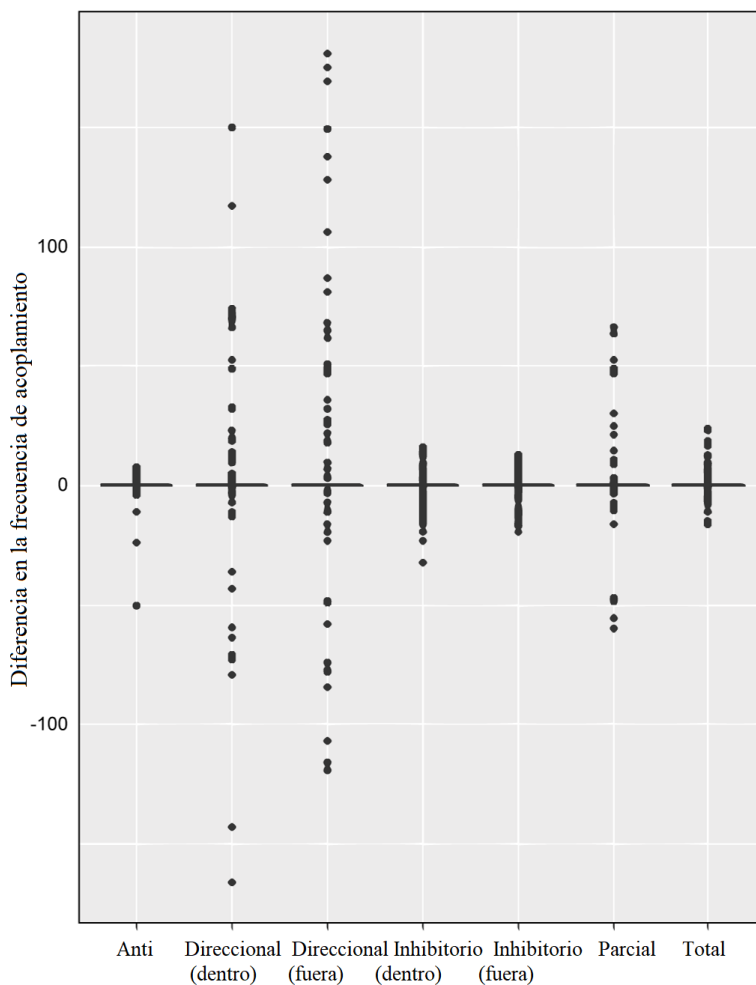


Figura 12. Cambio en la frecuencia de acoplamiento de interruptores metabólicos en el modelo control frente al modelo lipotóxico. El diagrama de cajas muestra la comparación de los perfiles de acoplamiento de las reacciones controladoras críticas en el escenario inflamatorio frente al "saludable"/control. Las reacciones controladoras críticas en el modelo lipotóxico y las reacciones redundantes e intermitentes en el modelo sano se consideran interruptores metabólicos. Los valores negativos indican un bajo número de acoplamientos en los modelos metabólicos y los valores positivos indican muchos acoplamientos. El número de acoplamientos anti y completos de las reacciones impulsoras críticas en el modelo lipotóxico es similar en el modelo sano, mientras que las reacciones inhibitorias, parciales y direccionales varían.

Considerando lo anterior, enfocamos nuestro análisis en los 25 interruptores metabólicos y su influencia en el fenotipo metabólico astrocítico cuando es modulado por PA (Figura 13). Como se mencionó anteriormente, los astrocitos utilizan glucosa a través de la glucólisis como fuente de energía primaria, generando piruvato como producto principal. Por supuesto, hubo un estrecho acoplamiento entre la producción de piruvato y las reacciones

oxidativas de la glucosa en el modelo de astrocito sano. Sin embargo, en presencia de PA, las reacciones asociadas con la glucólisis: catálisis de gliceraldehído 3-fosfato a D-glicerato 1,3-bisfosfato (GAPD, EC .1.2.1.12) por gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y catálisis de la transferencia reversible de un grupo fosfato de 1,3-bisfosfoglicerato a ADP que produce 3-fosfoglicerato y ATP (PGK, EC. 2.7.2.3) por la fosfoglicerato quinasa, pueden inhibirse parcialmente, especialmente por la interacción de acoplamiento activo debido a su papel en la co-producción de piruvato (Figura **suplementaria 1**). Este resultado sugiere que PA aumenta la dependencia de la oxidación de ácidos grasos en los astrocitos (Fell, 2005; Rose et al., 2020; Schafer et al., 2004; M. Yang & Vousden, 2016). Los perfiles inhibitorios descritos anteriormente alteran las reacciones asociadas con el metabolismo del folato FTCD (GluForTx , EC. 2.1.2.5; 4.3.1.4) discutidas anteriormente y la reacción de catálisis del argininosuccinato por la argininosuccinato sintasa (ARGSS, EC. 6.3.4.5) asociada con el metabolismo de la urea. Esto confirma el papel previsto de estas reacciones como impulsores críticos en un escenario dentro de PA, pero no en el escenario de control.

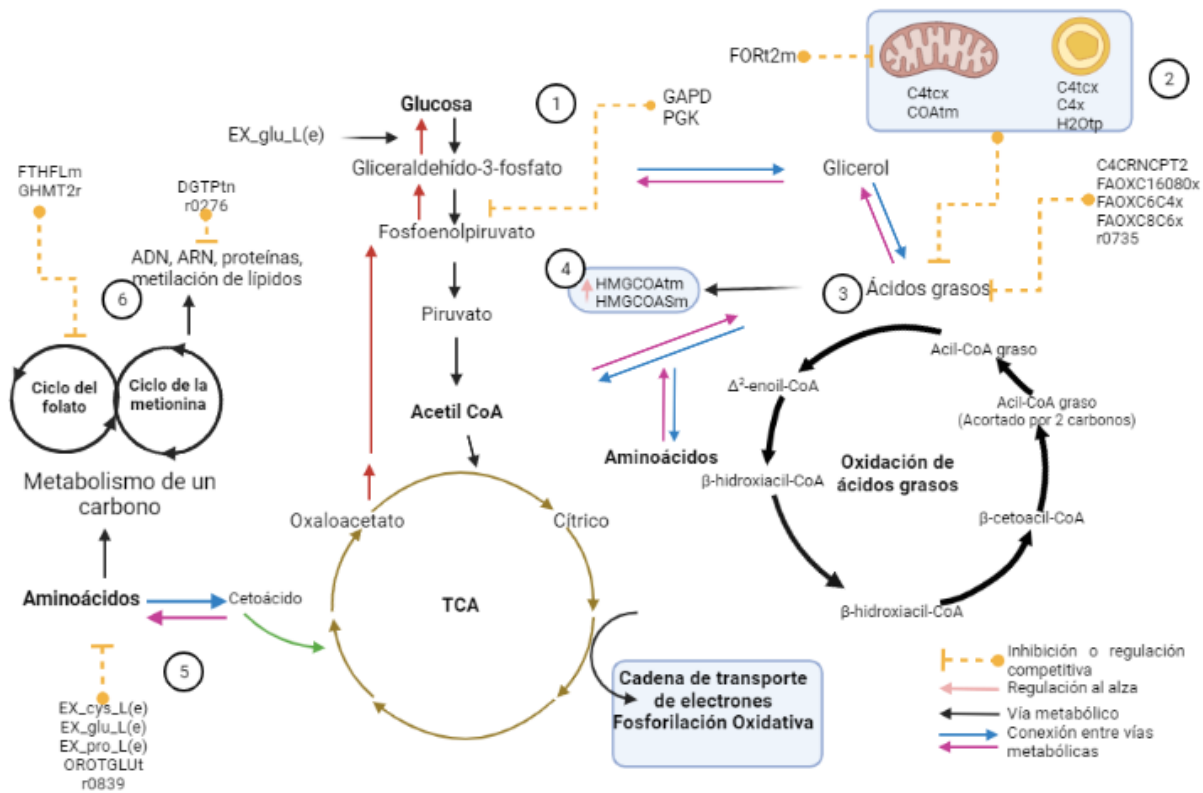


Figura 13. La presencia de 25 interruptores metabólicos en el modelo lipotóxico permite identificar reacciones críticas.

(1) En los astrocitos, la glucosa se usa a través de la glucólisis como fuente de energía primaria; sin embargo, PA regula negativamente las reacciones asociadas con esta vía metabólica a través de GAPD y PGK. Además, se ha demostrado que la exposición recurrente a niveles bajos de glucosa aumenta la dependencia de la FAO de los astrocitos. En nuestro modelo, la presencia de PA puede modular y alterar la COAtm, afectando la descarboxilación oxidativa del piruvato. (2) Los ácidos grasos (FA) con menos 12-C pueden ingresar directamente a las mitocondrias; sin embargo, los ácidos grasos con 13-21 carbonos necesitan la lanzadera de carnitina para pasar a la mitocondria. En presencia de PA, las reacciones de transporte de carnitina C4tcx, C4tmc y C4x mostraron regulación a la baja. (3) la β-oxidación es la ruta preferible para la síntesis de AC-CoA. En presencia de PA, puede verse alterado por la regulación negativa de C4CRNCPT2, que transporta carnitina para la hidrólisis final de los ácidos grasos y modula las reacciones FAOXC16080x, FAOXC6C4x, FAOXC8C6x y r0735. (4) PA aumenta HMGCOASim y HMGCOAtm, probablemente generando una alta producción de cuerpos cetónicos, que actúan como combustible alternativo. (5) La cisteína Ex_cys_L junto con el glutamato Ex_glu_L permite la síntesis de glutatión (GSH). En el caso del estrés oxidativo generado por PA, se afecta la producción de ROS dependientes de NADPH, desregulando el estado redox. En nuestro modelo, las reacciones asociadas con la biosíntesis de pirimidinas, OROTGLUT y r0839, demostraron un papel crítico en presencia de PA; Ex_cys_L se presentó como una reacción crítica debido a sus diferentes roles, especialmente en la producción de GSH y palmitoilación. (6) Las reacciones asociadas con la ruta del folato se han determinado

como esenciales en la etapa lipotóxica. Estas reacciones son FTHFLm, MTHFD y GHMT2r. También encontramos interruptores metabólicos involucrados en el mantenimiento celular que, en presencia de PA, los cuales modulan las vías metabólicas centrales y secundarias, incluidos EX_pro_L (e), FORT2m (para el transporte de formiato mitocondrial), DGTPtn (difusión de DGTP en el núcleo) y transporte de H₂O.

El cambio de flujo en el modelo lipotóxico genera una modulación inhibitoria parcial o total del transporte de CoA mitocondrial (COAtm), afectando la descarboxilación oxidativa de piruvato a acetil-CoA y la esterificación de ácidos grasos (proceso dependiente de ATP) (Rose et al., 2020). En este proceso, la lanzadera de carnitina necesita atravesar la membrana mitocondrial y oxidarse para metabolizar los ácidos grasos. Por lo tanto, y como se mencionó anteriormente, la carnitina representa un biomarcador y, al mismo tiempo, está completamente acoplado con reacciones del ciclo de β -oxidación. Esto podría indicar que las reacciones asociadas a su transporte (C4tcx, C4tmc, C4x y C4CRNCPT2, EC. 2.3.1.21) son esenciales en el metabolismo de los astrocitos ya que pueden modular el transporte de los tioésteres de la coenzima A (Acyl-CoA). En presencia de PA, encontramos que las reacciones asociadas al transporte de carnitina no se inhiben completamente, pero generan una modulación a la baja de las reacciones totalmente acopladas: relacionadas con la β -oxidación de ácidos de cadena larga (FAOXC16080x, EC. 2.3.1.16; 2.3.1.155; 2.3.1.9), β -oxidación de ácidos grasos C8->C6 (FAOXC8C6x, EC. 4.2.1.17; 5.3.3.8; 1.1.1.35), β -oxidación de ácidos grasos C6->C4 (FAOXC6C4x, EC. 1.1.1.n12; 4.2.1.107; 4.2.1.119) y r0735, afectando así la oxidación de ácidos grasos e induciendo su acumulación en el retículo endoplásmico (Piccolis et al., 2019; Souza et al., 2019; S. Y. Yang et al., 1987). Lo anterior conduce a la regulación positiva de la formación de cuerpos cetónicos a través del acoplamiento direccional y el cambio en el flujo metabólico a reacciones asociadas con las enzimas mitocondriales HMG-CoA sintasa, en nuestro caso hidroximetilglutaril -CoA sintasa (HMGCOASim, EC. 2.3.3.10) y 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) (HMGCOAtm) (Farmer et al., 2020; Le Foll & Levin, 2016).

Por otro lado, los carbonos de glucosa también se pueden utilizar para sintetizar cisteína, que, junto con el glutamato (Ex_glu_L en el modelo) es utilizado para la síntesis de glutamina, permitiendo la síntesis de glutatión (GSH), que es esencial para la amortiguación redox (M. Yang & Vousden, 2016). Además, el estrés oxidativo generado por AP puede regularse reprimiendo el metabolismo de la glucosa, disminuyendo la producción de ROS

extracelulares dependientes de NADPH (Arnedo et al., 2011; Rose et al., 2020; Vicente-Gutierrez et al., 2019).

Como se mencionó anteriormente, las reacciones asociadas con la vía del folato se han determinado previamente como esenciales en el escenario lipotóxico. Esta vía apoya la transferencia de unidades de carbono de la serina para procesos biosintéticos. Sin embargo, cuando esta vía es modulada negativamente, se genera una disminución en la biosíntesis de NADPH debido a la deficiencia de NAD⁺ (Bailey & Gregory, 1999; Field et al., 2014). De acuerdo con estos hallazgos, nuestro modelo predice la regulación de la reacción de la formiato - tetrahidrofolato ligasa (FTHFLm, EC. 1.1.1.300), que participa en la transferencia de unidades de carbono, esenciales para varias rutas biosintéticas. Además, está directamente relacionado con el MTHFD discutido anteriormente, que en presencia de un insulto puede afectar las funciones de mantenimiento mitocondrial y la homeostasis celular (Bailey & Gregory, 1999; Coppedè, 2021; Coppedè et al., 2006; Shi et al., 2021).

Como mostramos anteriormente, una de las vías metabólicas que tiene más acoplamientos direccionales e inhibitorios con otras vías es el ciclo del folato. También se alteran otros interruptores metabólicos asociados con diferentes vías metabólicas dependientes de NADPH, como la reacción relacionada con la GMP reductasa (Field et al., 2014; Rose et al., 2020). La GMP reductasa cataliza la desaminación irreversible de GMP para la conversión de nucleótidos de guanosina en nucleótidos de inosina, precursores de los nucleótidos de adenosina, que mantienen el equilibrio de nucleótidos intracelulares (Ipata & Tozzi, 2006). Encontramos que la reacción asociada con la Glicina hidroximetiltransferasa (GHMT2r, EC. 2.1.2.1) se representa como crítica ya que es parte de la poliglutamilación del folato, pero también está total y direccionalmente acoplado al metabolismo de purina, serina, alanina y treonina (Fell, 2005; Rose et al., 2020; Yin, 2015). La glicina es una fuente importante para transferir unidades de carbono a través de intermediarios de folato porque una modulación descendente representaría una modulación negativa en el ciclo del folato (Rose et al., 2020; M. Yang & Vousden, 2016). Finalmente, otras reacciones como EX_pro_L (e), FORT2m (para el transporte de formiato mitocondrial), DGTPtn (difusión de desoxiguanosina-trifosfato en el núcleo) y el transporte de H₂O son vías metabólicas indirectamente moduladas por el ácido palmítico y son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis cerebral (Badaut, 2010; Leanza et al., 2008; Nagelhus & Ottersen, 2013;

Pietzke et al., 2020). Es importante tener en cuenta que los intermediarios asociados a cada ruta metabólica proporcionan precursores para la biosíntesis de varias clases de moléculas. Así, cualquier alteración que puede modificar los procesos biosintéticos, altera la homeostasis celular astrocitaria y repercutir en los procesos metabólicos de cooperación neuronal.

Aunque nuestro modelo demostró el papel de control (inhibidor) de las reacciones asociadas al antiportador glutamato-rotato (OROTGLUt), es importante mencionar que en las células eucariotas, la ausencia de este antiportador o su modulación impide la captación de ácido orótico (AO), demostrando una capacidad limitante para utilizar AO, y por tanto, generar una modulación inhibitoria del transporte de orotato (r0839) para la biosíntesis de pirimidinas de RNA (Fumagalli et al., 2017; Sonnewald et al., 1998). Nuestro modelo también encontró una modulación del intercambio de cisteína (Ex_cys_L), que tiene varias funciones cruciales en las células astrocitarias al contribuir a la producción de GSH y palmitoilación (Butland et al., 2014; F. B. Young et al., 2012). Además, la palmitoilación también permite el ajuste de las funciones de las proteínas (Young et al., 2012).

Finalmente, dentro de estos 25 interruptores metabólicos, comparamos los cambios metabólicos entre el modelo metabólico PA y el modelo astrocítico bajo pretratamiento con tibolona, es decir, reacciones críticas en el modelo PA y redundantes en las células tratadas con tibolona y astrocitos sanos. En total, encontramos nueve reacciones de este tipo, incluyendo transporte nuclear, peroxisomal y extracelular, así como glucólisis/gluconeogénesis y metabolismo de aminoácidos (Tabla 7). El hecho de que estas reacciones puedan ser controladas por otras reacciones en el escenario de tibolona pero no en el inflamatorio implica que serían clave para el tratamiento protector. Por lo tanto, el posible papel de disminuir el acoplamiento inhibitorio o competitivo de la mayoría de las reacciones y la capacidad protectora de la tibolona probablemente resida en estas nueve reacciones. Sin embargo, será necesaria más investigación para evaluar la importancia de los cambios metabólicos propuestos aquí.

Tabla 7. Conjunto de reacciones críticas del modelo PA que tienen un papel divergente en los modelos sano y de tibalona.

Reacción	PA_ modelo	modelo saludable	modelo tibolona	Subsistema
DGTPtn	Crítico	Intermitente	Intermitente	transporte nuclear
EX_glu_L (e)	Crítico	Intermitente	Intermitente	Reacción de intercambio/demanda
EX_pro_L (e)	Crítico	Intermitente	Redundante	Reacción de intercambio/demanda
GPD	Crítico	Intermitente	Intermitente	Glucólisis/gluconeogénesis
GHMT2r	Crítico	Intermitente	Intermitente	Metabolismo de la glicina, serina, alanina y treonina
H2Otp	Crítico	Intermitente	Intermitente	Transporte peroxisomal
OROTGLUt	Crítico	Intermitente	Redundante	Transporte, extracelular
PGK	Crítico	Intermitente	Intermitente	Glucólisis/gluconeogénesis
r0839	Crítico	Intermitente	Redundante	Transporte, extracelular

5.6 Potenciales blancos terapéuticos asociados a los nodos controladores

Dados los 25 interruptores metabólicos identificados anteriormente y su influencia en el fenotipo metabólico astrocítico modulado por PA, caracterizamos las estructuras de las enzimas implicadas en las reacciones controladoras anteriormente descritas (Tabla suplementaria 3). Como se ha mencionado, las enzimas descritas en este estudio tienen un papel esencial en el metabolismo astrocitario, siendo objetivos clave para la homeostasis celular en un estado saludable. Reacciones como FTHFL asociada al metabolismo del folato, C4CRNCPT2, que transporta carnitina para la hidrólisis final de los ácidos grasos y que a su vez modula las reacciones FAOXC16080x, FAOXC6C4x, FAOXC8C6x, son ejemplo de las reacciones que han sido experimentalmente estudiadas en la modulación de vías metabólicas centrales y secundarias del astrocito en presencia de PA (Piccolis et al., 2019; Souza et al., 2019; S. Y. Yang et al., 1987). Estas reacciones son elementos clave

en la fisiopatología de enfermedades complejas puesto que son las coordinadoras de la afectación asociada a lipotoxicidad y, por ende, constituyen blancos terapéuticos promisorios, pues su intervención podría reflejarse en el aumento de la eficacia terapéutica, dada la exploración sistémica previamente desarrollada. En ese sentido, realizamos una primera caracterización del potencial terapéutico de cada proteína, mediante la caracterización *in silico* de cavidades con potencial drogable en las estructuras de las 25 proteínas. La detección, caracterización y análisis de cavidades nos permitirá posteriormente realizar la predicción de la unión de ligandos covalentes (fármacos) y por lo tanto promover el estudio y/o diseño de fármacos con potencial de interacción con las proteínas de las reacciones controladoras (Xu et al., 2018).

Para la detección y caracterización de cavidades, se han adoptado métodos basados en geometría estructural, análisis de la superficie de proteínas, así como, el análisis del volumen de las cavidades, área de superficie y la capacidad de formación de enlaces de hidrógeno (Cammisa et al., 2012; Greener & Sternberg, 2015; Gupta et al., 2018), siendo la finalidad de estos métodos el identificar en las proteínas características estructurales que favorecen el reconocimiento del ligando. En ese sentido, realizamos una primera caracterización del potencial terapéutico de cada proteína, para lo que se realizó la caracterización *in silico* de cavidades con potencial drogable (o potencial de unión covalente) en las estructuras de las 25 proteínas (Tabla suplementaria 4).

Encontramos 16 enzimas con cavidades potencialmente drogables que, a su vez, contienen el sitio activo de la proteína (Tabla suplementaria 5). En contextos patológicos, como es el caso de la obesidad, se ha estudiado la capacidad de inhibición o activación de enzimas asociadas a la oxidación de ácidos grasos. La enzima 3-cetoacil-CoA tiasa ha sido ampliamente estudiada para el tratamiento con trimetazidina para mejorar la resistencia a la insulina en ratones obesos de manera experimental (Dhote et al., 2022; Xia et al., 2019). Sin embargo, estudios recientes han demostrado el efecto positivo de la combinación de la trimetazidina y la progesterona en la lesión cerebral (Ussher et al., 2014). Las interacciones de las dianas moleculares como 3-cetoacil-CoA tiasa (Uniprot ID: P09110), la enoil reductasa (Uniprot ID: Q9BV79) con los ligandos propuestos, demostró la formación de múltiples interacciones (alquilo, pi-sigma, pi-cati3n) con los aminoácidos Ser-, Val- y Phe- presentes en el sitio activo de las enzimas, indicando su potencial como potenciales receptores de fármacos. Lo anterior concuerda con nuestros resultados, al presentar

interacciones similares con el ligando natural de las enzimas, especialmente con la enzima 3-cetoacil-CoA tiolasa generando estabilización molecular (Figura 14). A nivel experimental, se ha demostrado que esta estabilización con las dianas moleculares (trimetazidina y progesterona) para las dos enzimas evaluadas, puede activar procesos de neuroprotección al reducir, 1) el estrés oxidativo y 2) la inflamación en la lesión por isquemia demostrando la capacidad farmacológica de los ligandos evaluados (Dhote et al., 2022; Ussher et al., 2014).

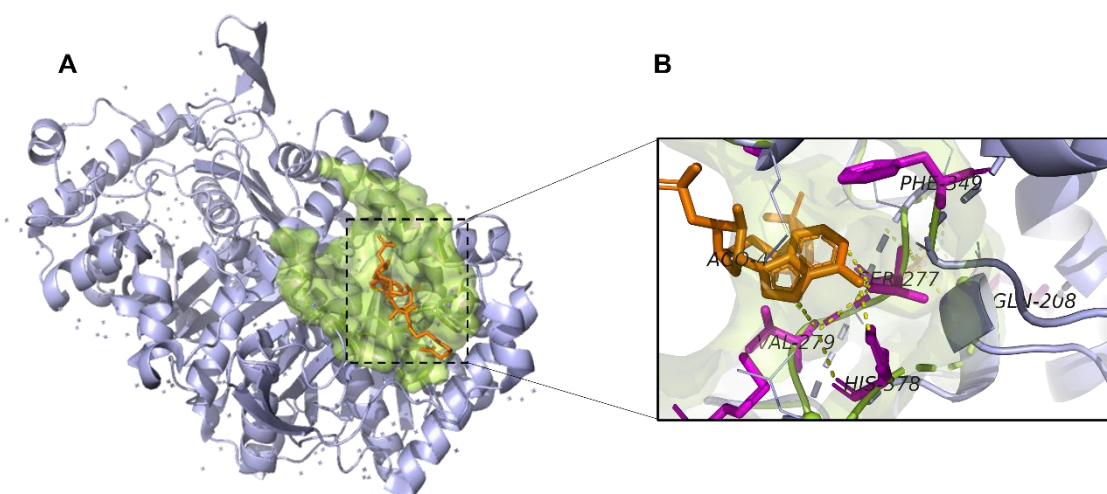


Figura 14. Representación superficial de la estructura monomérica de la enzima 3-cetoacil-CoA tiolasa (Uniprot ID: P09110). La enzima 3-cetoacil-CoA tiolasa cataliza la reacción de condensación de acil-CoA o acil-acil ACP con malonil-CoA para formar 3-cetoacil-CoA ().(A) Cavidad drogable del sitio activo (verde) de la enzima en presencia del ligando natural Acetil Coenzima A (naranja). (B) Ampliación de la vista de las interacciones entre los aminoácidos del sitio activo y el ligando natural.

Respecto a la enzima trans 2-enoil CoA reductasa peroxisomal, se han encontrado aminoácidos conservados en el sitio activo como Arg50, Arg82, Ser120 y Phe112, esenciales para la catálisis (reducción de 2-enoil CoA para producir un acil CoA saturado), los mismo encontrados en nuestras simulaciones como puntos de estabilización para la interacción con un posible fármaco. Si bien son pocos los estudios relacionados con la inhibición de esta enzima, se ha logrado determinar la inhibición de esta enzima por mutaciones en su sitio activo, debido a la inestabilidad molecular, lo cual, perjudica el acoplamiento con el ligando natural e inhibiendo la actividad de elongación de los ácidos grasos y generando un cambio en el perfil de esfingolípidos. Lo anterior conduce a procesos

de demencia no sindrómicos, por lo que, a inhibición del sitio activo de esta enzima impacta en la función, sugiriendo que, la intervención de esta cavidad puede intervenir la función enzimática y a su vez, puede mejorar el contexto patológico de interés (N. Zhang et al., 2016). Además, se ha descrito que si bien rara vez se investiga el papel de la familia de proteínas de elongación de ácidos grasos (HACD), se sugiere que ligandos que modulen la esta proteína pueden brindar protección contra la adiposidad al aumentar la oxidación de ácidos grasos manteniendo la homeostasis energética, siendo entonces, un objetivo terapéutico prometedor para el manejo de la obesidad y las enfermedades metabólicas asociadas (N. Zhang et al., 2016).

Además de nuestros hallazgos anteriores, quisimos estudiar el potencial alostérico de las 16 enzimas con potencial drogable con la finalidad de la regulación de las macromoléculas mediante la unión de un ligando (fármacos alostéricos) en el sitio activo de la proteína y luego afectar la función de otros sitios de esta. Por lo tanto, encontramos que 13 de las 16 proteínas cuentan con un potencial alostérico en una o más de sus cavidades. Como se mencionó anteriormente, los astrocitos tienen un metabolismo altamente energético, sin embargo, en presencia de PA, las reacciones asociadas a la glucólisis pueden inhibirse. A nivel del sitio activo, una cavidad con potencial drogable fuerte, se ha encontrado que el inhibidor de la quinasa reguladora del ciclo celular de levadura NG52, al acoplarse en el sitio activo de PGK (W. Wang et al., 2020), disminuye la fosforilación de proteínas importantes como la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 regulando la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (Balog, 2014). Además, se ha demostrado que NG52 podría inhibir la proliferación de gliomas mediante la inhibición farmacológica de PGK (W. Wang et al., 2020).

Respecto a la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), se ha demostrado que cuenta con un sitio catalítico en cada uno de sus monómeros, en donde encontramos una cavidad con potencial fuertemente drogable que tiene potencial de regular alostéricamente dos cavidades opuestas al sitio activo (Figura suplementaria 2A). De acuerdo con estudios realizados por (Barinova et al., 2018), se ha determinado que la interacción de esta enzima con alfa-sinucleína en cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson tienen una alta influencia en las propiedades catalíticas de la enzima (Ayyildiz et al., 2020). Se ha determinado que la interacción entre alfa-sinucleína y el sitio activo de

GAPDH, específicamente con los residuos de cisteína, están directamente involucrados en la catálisis, por lo que la interacción de la alfa-sinucleína con estos residuos ha mostrado (mediante simulación molecular), una inactivación de la proteína incrementando la propensión a agregación de alfa-sinucleína. Lo anterior, junto a otros estudios, ha demostrado que la modulación de esta enzima podría ser una de las causas de los cambios patológicos característicos observados en la EP (Ayyildiz et al., 2020; Barinova et al., 2018). Sin embargo, se destaca la regulación alostérica de la canalización de sustratos en el sitio activo de esta enzima, en donde, se describe cavidades alostéricas cerca de la región catalítica, que coincide con un loop modulado por las fosforilación de Ser50, Ser 203 y Tyr 41 en la regulación de la actividad enzimática a través del ensamblaje del oligómero y el sitio de unión a NAD (Ayyildiz et al., 2020). Estudios realizados por (Ayyildiz et al., 2020) indican que Ser 50 y Tyr 41 juegan un papel importante en la estabilización enzimática y, por lo tanto, en la regulación del metabolismo al interactuar con GAPDH, mediante regulación alostérica de las diferencias en las tasas de desactivación enzima-sustrato entre diferentes sustratos o isoenzimas.

Como se ha mencionado previamente, el daño con PA en astrocitos modula la oxidación de ácidos grasos. Dentro de las reacciones controladoras, analizamos las enzimas relacionadas a estos procesos, cuyas cavidades drogables cuentan con potencial de regular alostéricamente otras regiones de la proteína (Reductasa de proteína transportadora de enoil-acilo; Carnitina palmitoiltransferasa II (CPT-2); enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxiacil CoA deshidrogenasa; Enzima peroxisomal multifuncional tipo 2; acil-coenzima A oxidasa 1 del peroxisoma; Enzima Carnitina O-octanoiltransferasa peroxisomal). Si bien son pocos los estudios relacionados con la identificación de sitios potencialmente alostéricos con estas enzimas, la carnitina palmitoiltransferasa es un actor central en el metabolismo de lípidos, ya que cataliza el primer paso hacia la oxidación de ácidos grasos (Hu et al., 2022). Se ha descrito que la mayoría de los inhibidores de esta enzima se unen al sitio activo interactuando con los aminoácidos Lys 379 y la estabilización dada por la formación de puentes de hidrógeno entre el sustrato y los aminoácidos Ser 338 y Ala 339 (Hu et al., 2022). Dentro de los inhibidores más estudiados están los ácidos carboxílicos de oxirano y análogos de acilcarnitina (análogos de sustrato) (Hu et al., 2022; Jarugumilli et al., n.d.). Sin embargo, debido a la cantidad de sitios alostéricos que presenta esta enzima, se ha descrito (desde un punto de vista mecánico), que aunque la mayoría de inhibidores se unen al sitio

activo, algunos se unen al sitio alostérico (cavidad 4 y 7) de la malonil-coenzima A, lo cual concuerda con nuestros resultados (Figura 15). Se ha determinado que algunos de los inhibidores estudiados son eficaces contra la enfermedad de Alzheimer, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Hu et al., 2022; Paraiso et al., 2021).

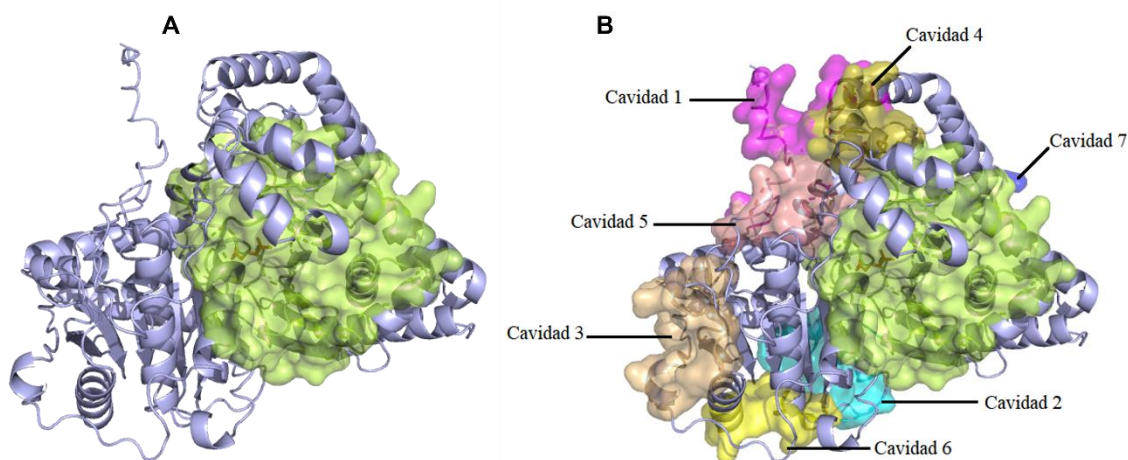


Figura 15. Cavidades detectadas con potencial drogable alostéricas al sitio de unión al ligando natural de la carnitina palmitoiltransferasa 2 (Uniprot ID: P23786). (A) Cavidad drogable asociada al sitio de unión al ligando (verde); (B) Cavidades alostéricas altamente correlacionadas con el sitio de unión al ligando.

Si bien existe poca información asociada al modelamiento alostérico enfocado a la enzima Carnitina O-octanoiltransferasa peroxisomal, se ha demostrado que esta enzima, cuenta con una alta homología del sitio activo (63,1%) con la enzima carnitina palmitoiltransferasa y que al igual que esta última, los inhibidores no selectivos (inhibidores que afectan a más de una isoenzima), tienen un mecanismo de inhibición alostérica con esta enzima al no unirse al sitio catalítico, si no al sitio de unión más cercano al sitio activo (Figura suplementaria 3D, cavidades 2 y 4) (Ceccarelli et al., 2011).

Respecto a la enzima guanosina monofosfato reductasa, autores como (H. Liu et al., 2018) han propuesto la enzima como una potencial diana terapéutica para la enfermedad de Alzheimer, en donde evaluaron 1174 medicamentos aprobados por la FDA, encontrando 5 fármacos como candidatos (Lumacaftor, ledipasvir, deslanosida, lurasidona y eltrombopag). De forma interesante, los autores encontraron que en la interacción con los fármacos se produjo una alta formación de puentes de hidrógeno en el sitio activo especialmente con el

aminoácido Cys186 y el loop conformado por los residuos 129-133 y la región 268-190 (H. Liu et al., 2018), corrigiendo el plegamiento de la proteína, lo que probablemente indica que estos medicamentos pueden inhibir la enzima (J. Li et al., 2006; Salvatore et al., 1998). Si bien se ha descrito el potencial alostérico de esta enzima al ser inhibida por la proteína desacopladora (UCP-1), aún son pocos los estudios que describen sus cavidades alostéricas. Por otro lado, la enzima C-1-tetrahidrofolato sintasa (MTHFD1), enzima que participa en el metabolismo del folato, ha sido propuesta como blanco terapéutico para el tratamiento de carcinoma de páncreas mediante su interacción con el fumarato de dimetilo (DMF) (K. Chen et al., 2021). Estos estudios han determinado que el DMF interactúa con cavidades cercanas al sitio activo de MTHFD1 y DMF, mediante la unión específica con dos residuos de cisteína, cys143 y cys236, modificando covalentemente los residuos de cisteína y eventualmente, interrumpiendo el metabolismo del folato (K. Chen et al., 2021). Lo anterior es de interés ya que, el DMF inhibe posiblemente la proteína al afectar diferentes sitios de unión, diferentes al sitio catalítico, por lo que, es posible que estas cavidades drogables regulen a otras cavidades de la proteína.

Como parte de este estudio, se proponen la enzima portadora de pirofosfato de tiamina mitocondrial, la enzima transportadora de solutos 22 miembro 7, la enzima peroxisomal multifuncional tipo 2 y la enzima peroxisomal acil-coenzima A oxidasa 1, como proteínas novedosas como potencial terapéutico para las patologías promovidas por la condición de lipotoxicidad, dado que a la fecha no hay estudio que reporten su valor en este contexto.

Finalmente, es importante destacar que las enfermedades neurodegenerativas, como cualquier enfermedad multifactorial, presentan múltiples alteraciones en diferentes mecanismos celulares y moleculares. En ese sentido, el estudio holístico de las condiciones patológicas que promueven dichas enfermedades, como la lipotoxicidad por PA en astrocitos, es fundamental para el desarrollo de tratamientos eficaces. Aunque en el presente estudio se identificaron todas las reacciones claves en el insulto astrocitario con PA, así como los potenciales blancos terapéuticos relacionados, se hace necesario continuar con la caracterización de dichos potenciales blancos desde una perspectiva polifarmacológica, de manera que se logren identificar cavidades drogables comunes entre las 16 proteínas identificadas y así puedan proponerse ligandos que regulen más de una reacción controladora a la vez.

6. Conclusiones y perspectivas

6.1 Conclusiones

En este estudio, nos hemos centrado en el PA y su papel regulador en las células astrocitarias a nivel multiómico. Al actualizar un modelo metabólico a escala del genoma publicado anteriormente, realizamos una integración de datos transcriptómicos y proteómicos mediante un enfoque novedoso. Este enfoque nos permitió identificar reacciones de tipo controlador que previamente se habían caracterizado experimentalmente como críticas. Estas reacciones mostraron un papel esencial en el metabolismo de los astrocitos, no solo a nivel local (donde desempeñan su función principal) sino también controlando directa o indirectamente otras reacciones. Caracterizamos estas reacciones como cambios metabólicos en el modelo lipotóxico, siendo puntos clave para la homeostasis de los astrocitos en un estado saludable.

Estos resultados prometedores resaltan la viabilidad de aplicar la teoría del control para postular reacciones previamente identificadas o sugerir otras nuevas como posibles objetivos de estudio o tratamiento. Este enfoque facilitó la comprensión de los aspectos mecánicos del control dentro de la célula astrocitaria, como la inhibición de la producción de energía a través de la β -oxidación de ácidos grasos o el ciclo del folato (reacciones FTHFL y MTHFD), cambiando a la formación de cuerpos cetónicos por regulación positiva de HMGCOASim, mecanismos altamente descritos en procesos de estrés generados por PA. Además, encontramos que el transporte nuclear, peroxisomal y extracelular, así como la glucólisis/gluconeogénesis y el metabolismo de aminoácidos son críticos solo en la condición de PA pero no en astrocitos sanos o tratados con tibolona. Dicha información no solo permitiría comprender mejor el nivel sistémico de la respuesta astrocitaria a PA y tibolona, sino que también sentará las bases para futuras investigaciones farmacológicas, orientadas a crear terapias más efectivas, y en el campo del control, encaminadas a extender su aplicaciones en los fenómenos biológicos, como el posible papel de estos interruptores metabólicos como efectores de oscilaciones multiómicas, como se ha sugerido para organismos como *Escherichia coli* (Bardozzo et al. 2020).

Así mismo, nuestros resultados han mostrado la capacidad de predictibilidad de este tipo de metodologías, ya que, la mayoría de los interruptores metabólicos propuestos están actualmente evaluados para el tratamiento de patologías como el Alzheimer, como es el caso de la enzima guanosina monofosfato reductasa. En ese sentido, las cavidades drogables que tienen potencial alostérico, representan un gran interés al tener un impacto adicional en la proteína y un mayor efecto inhibitorio respecto a las cavidades. Finalmente, nuestros resultados junto con este marco de estudio pueden usarse para explorar *in silico* los mecanismos de regulación de las células astrocitarias, dirigiendo un futuro trabajo experimental más complejo en enfermedades neurodegenerativas.

6.2 Perspectivas a futuro

A partir de los resultados y discusiones presentados, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en convalidar los resultados *in-silico* obtenidos en el presente trabajo con datos experimentales y de esta manera, comprender mejor los mecanismos metabólicos asociados a lipotoxicidad en los astrocitos.

Es por esto que, estos resultados están en proceso de validación experimental con el grupo de Bioquímica Experimental y Computacional de la Pontificia Universidad Javeriana, en donde se están adelantando ensayos con de oxidación de ácidos grasos (ab217602) y el ensayo de la actividad reductasa de HMG-CoA. Así mismo, estamos realizando el alineamiento de cavidades entre proteínas para la caracterización y determinación de propiedades estructurales similares entre enzimas para la proposición de nuevas moléculas o fármacos, capaces de modular varios blancos terapéuticos al mismo tiempo, potenciando su efecto terapéutico.

A partir de este proyecto buscamos contribuir a los esfuerzos previos liderados por los laboratorios de Bioquímica Experimental y Computacional de la Pontificia Universidad Javeriana y el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, ya que generamos el primer GEM multiómico de astrocito humano en estado normal y sometido a PA e identificamos por primera vez, de la estructura de control (i.e. grafo de acoplamiento de flujos, perfil de acoplamiento de flujos y reacciones controladoras) que está involucrada

en la desregulación del metabolismo astrocitario por un insulto con PA, los cuales permitirán generar hipótesis de trabajos posteriores.

6.3 Anexos

6.3.1 Datos transcriptómicos y proteómicos

El laboratorio obtuvo los datos del transcriptoma y del proteoma a partir de la línea celular Normal Human Astrocytes (NHA) de Lonza. Para los datos de proteómica y transcriptómica, se cultivaron tres lotes de NHA en Astrocytes Basal Medium (ABM, Lonza) y se trataron con tripsina. Las células se cultivaron en condiciones de 5% CO₂ y 37°C hasta que las células alcanzaron una confluencia cercana al 80% para luego ser utilizadas bajo diferentes tratamientos (ácido palmítico, pre tratamiento con tibolona más ácido palmítico).

El pretratamiento se realizó disolviendo tibolona (Sigma–Aldrich, T0827, St. Louis, MO, EE. UU.) en DMSO al 100 % como una solución madre 40 mM; se realizaron diluciones adicionales con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sin suero y sin rojo de fenol. Se probaron concentraciones entre (100 uM - 10 nM) en cultivo celular. El tiempo y la concentración óptimos de tibolona fue de 10 nM durante 24 h. La concentración final de DMSO fue <0,01%.

Después del tratamiento con tibolona, las células se lavaron con 2x PBS1X y se trataron con DMEM libre de suero que contenía ácido palmítico (P0500, Sigma, St Louis, MO, EE. UU.), BSA (albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos; Sigma A2153) como proteína transportadora. y carnitina (C0283, Sigma, St Louis, MO, EE. UU.) para transportar ácidos grasos a la matriz mitocondrial.

Las células se trataron con diferentes concentraciones de ácido palmítico (100 µM – 2000 µM). La concentración final de ácido palmítico utilizada fue de 2000 µM y el tiempo de tratamiento fue de 24 h. El grupo control incluyó una concentración final de 1,35% de BSA y carnitina 2 mM (Martin-jiménez & González, 2020).

Después del pretratamiento con tibolona (24 h) y el tratamiento con ácido palmítico (24 h), se realizó la extracción y cuantificación de proteínas, utilizando una preparación de lisis

compuesta por tampón RIPA (Thermo Scientific, Cat. 89900) y cóctel de inhibidores de proteasas Halt Thermo 1X (CAT-78425). Posteriormente, se realizaron ciclos de centrifugación a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos para extraer las proteínas presentes en el sobrenadante. Se utilizó una muestra de las proteínas solubilizadas para la cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinonínico (kit BCA1 Sigma-Aldrich).

El sedimento de proteína se envió al UC Davis Proteomics Core para la identificación proteómica. Para la digestión, las muestras fueron tratadas con ditioneitol (DTT) e incubadas a 37°C, para luego ser tratadas con yodoacetamida (IAA) e incubadas a temperatura ambiente. Se realizaron tratamientos con DTT para neutralizar la IAA. Se añadió AMIC y tripsina para diluir las muestras, que se desalinizaron utilizando la Macro Spin Column (Nest Group) (datos aún no publicados). Los péptidos digeridos se analizaron mediante LC-MS/MS junto con Proxeon Easy-nLC II HPLC y nanopulverización. El procesamiento de datos se llevó a cabo usando parámetros de escisión y un mapeo de datos contra la base de datos SwissProt para buscar péptidos únicos. Además, Sequest y AMANDA se utilizaron para la cuantificación sin etiquetas. Los resultados se procesaron con MaxQuant v1.6.10.43 y Perseus v 1.6.10.45. La transformación de intensidades de proteínas se realizó en R a partir del método de normalización y estabilización de la varianza (VSN). La imputación de datos se realizó utilizando el método de k-vecinos más cercanos (KNN). El análisis de expresión diferencial se realizó mediante la prueba de reproducibilidad optimizada (ROTS), evaluando las siguientes condiciones: PA frente a vehículo, PA con pretratamiento de tibolona frente a vehículo y PA con pretratamiento de tibolona frente a PA. El análisis de enriquecimiento funcional de proteínas se realizó utilizando g:Profiler. Finalmente, se realizó un análisis de red de co-expresión ponderada para visualizar las interacciones proteína-proteína dados los tratamientos (datos aún no publicados).

En cuanto al transcriptoma, las bibliotecas se prepararon extrayendo el ARN total utilizando el mini kit RNeasy (Qiagen, EE. UU.). Se utilizó ADNasa I sin ARNasa para evitar la contaminación de las muestras. Las muestras se almacenaron a -80 °C en un tampón libre de nucleasas para la secuenciación de ARN en una máquina Illumina HiSeq con una configuración de 2 × 150 pb, lo que produjo una profundidad de secuenciación de ~ 75 millones de lecturas por muestra. El control de calidad de la secuenciación se evaluó a través de QUARS (QUA de control por RNA-Seq; github.com/tluquez/QUARS). Se realizaron gráficos de saturación para evaluar la calidad de la secuenciación. El análisis de

expresión diferencial se realizó inspeccionando los recuentos de registros, utilizando DESeq2 para normalizar el tamaño de la biblioteca y reducir la varianza.

Tabla suplementaria 1. Conjunto de reacciones del metabolismo del sulfato de queratán con regulación positiva después del tratamiento con tibolona (ver documento anexo pdf).

Tabla suplementaria 2. Conjunto de reacciones críticas del modelo PA que tienen un papel crítico y divergente en los modelos sano y de tibolona (ver documento anexo pdf).

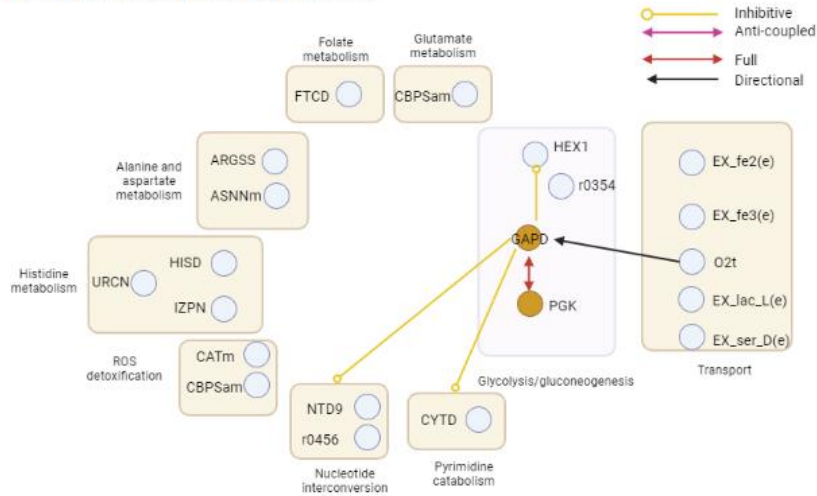
Tabla suplementaria 3. Información de la estructura terciaria y ligando asociado para cada proteína (ver documento anexo excel).

Tabla suplementaria 4. Información de cavidades con potencial drogable (o potencial de unión covalente) en las estructuras de las 25 proteínas (ver documento anexo excel).

Tabla suplementaria 5. Información de cavidades con potencial drogable (o potencial de unión covalente) en las estructuras de las 16 proteínas, que, a su vez, contienen el sitio activo de la proteína (ver documento anexo excel).

Figura suplementaria 1. Control de la glucólisis y su asociación con reacciones centrales de diferentes subsistemas metabólicos. (A) Gráfico de acoplamiento de flujo para la reacción GAPD, de una célula sana. Se observan relaciones de acoplamiento total y direccional, además de reacciones con acoplamiento competitivo o inhibitorio. (B) Gráfico de acoplamiento de flujo de la reacción crítica de GAPD en el modelo lipotóxico. En su mayoría se observan interacciones inhibitorias o competitivas con reacciones asociadas a otros subsistemas, relacionados con el metabolismo central de la célula, generando una regulación crítica del metabolismo celular.

A Flux coupling graph (Healthy model)



B Flux coupling graph (Lipotoxic model)

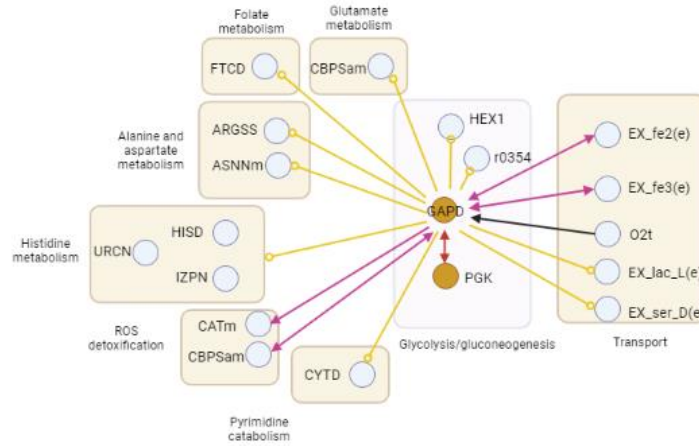


Figura suplementaria 2. Cavidades detectadas con potencial drogable alostéricas al sitio de unión al ligando natural de las 15 enzimas. Cavity drogable asociada al sitio de unión al ligando (verde). (A) Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; (B) C-1-tetrahidrofolato sintasa, citoplasmática; (C) Guanosina monofosfato reductasa; (D) Carnitina O-octanoiltransferasa peroxisomal; (E) Fosfoglicerato quinasa 2; (F) Peroxisomal acil-coenzima A oxidasa 1.

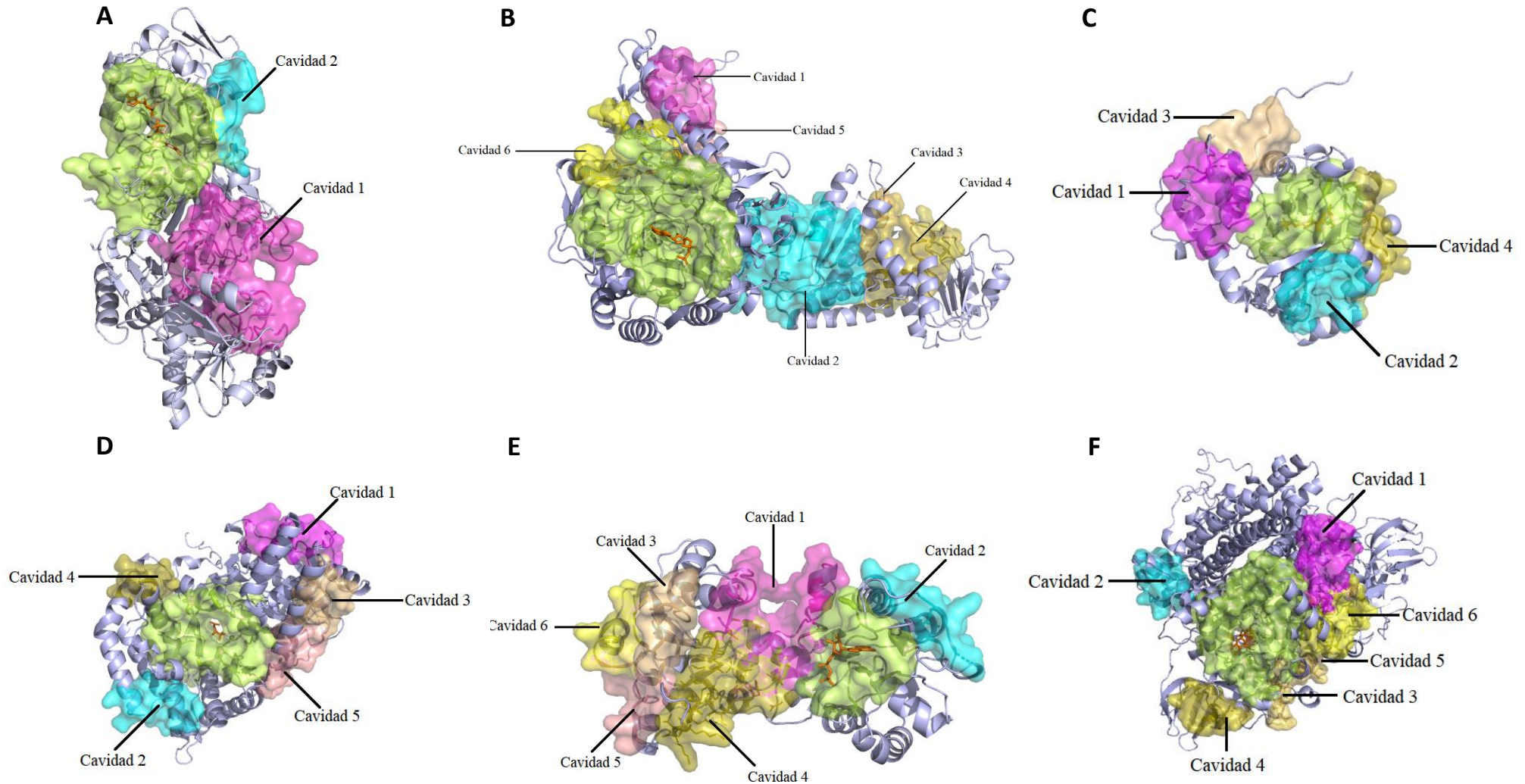


Figura suplementaria 2. Cavidades detectadas con potencial drogable alostéricas al sitio de unión al ligando natural de las 15 enzimas. Cavity drogable asociada al sitio de unión al ligando (verde). (G) Enzima peroxisomal multifuncional tipo 2; (H) Hidroximetilglutaril-CoA sintasa; (I) Familia de transportadores de solutos 22 miembro 7; (J) Fosfoglicerato quinasa 1; (K) Trans-2-enoil-CoA reductasa peroxisomal; (L) Enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxiacil CoA deshidrogenasa.

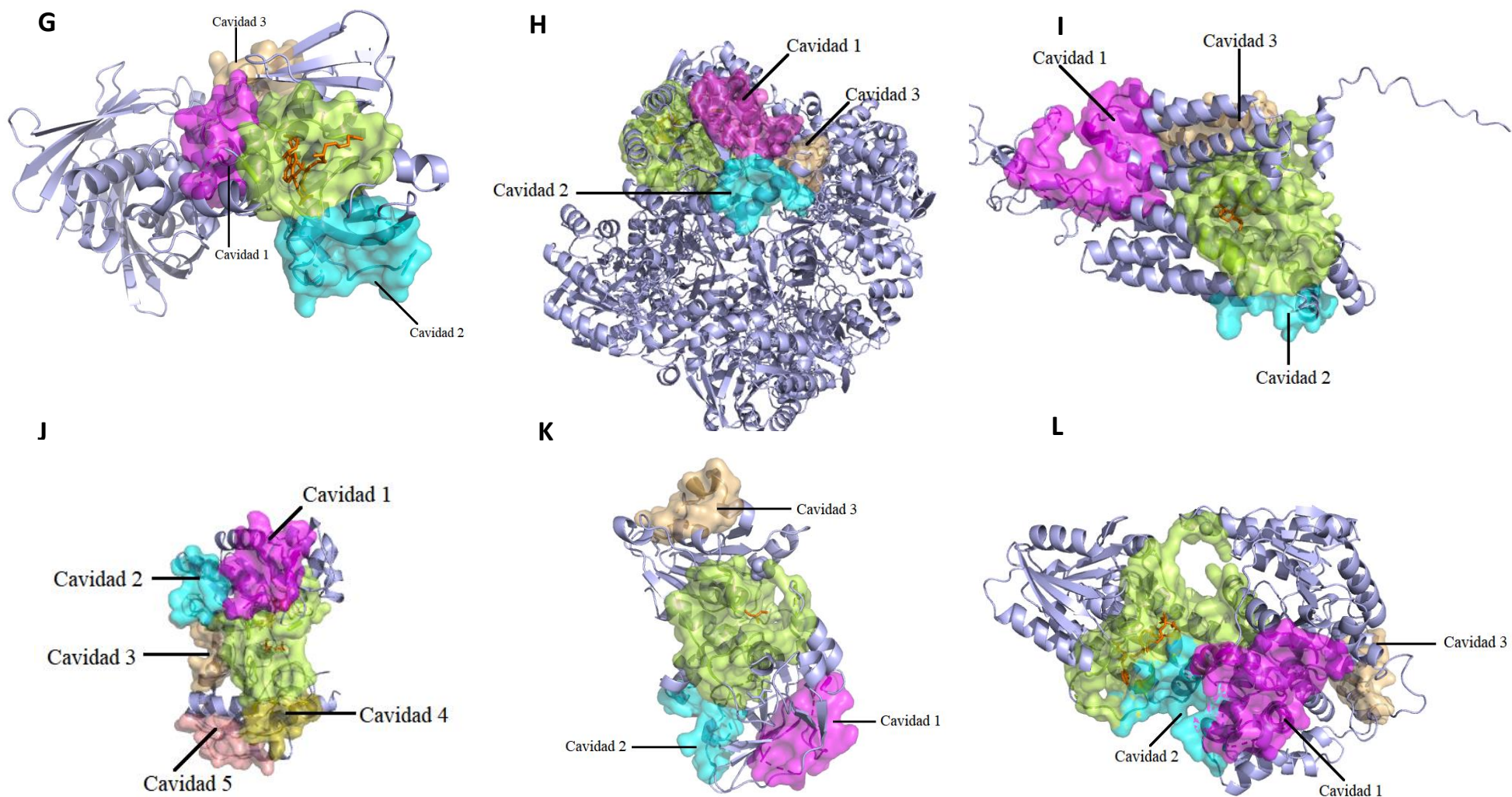
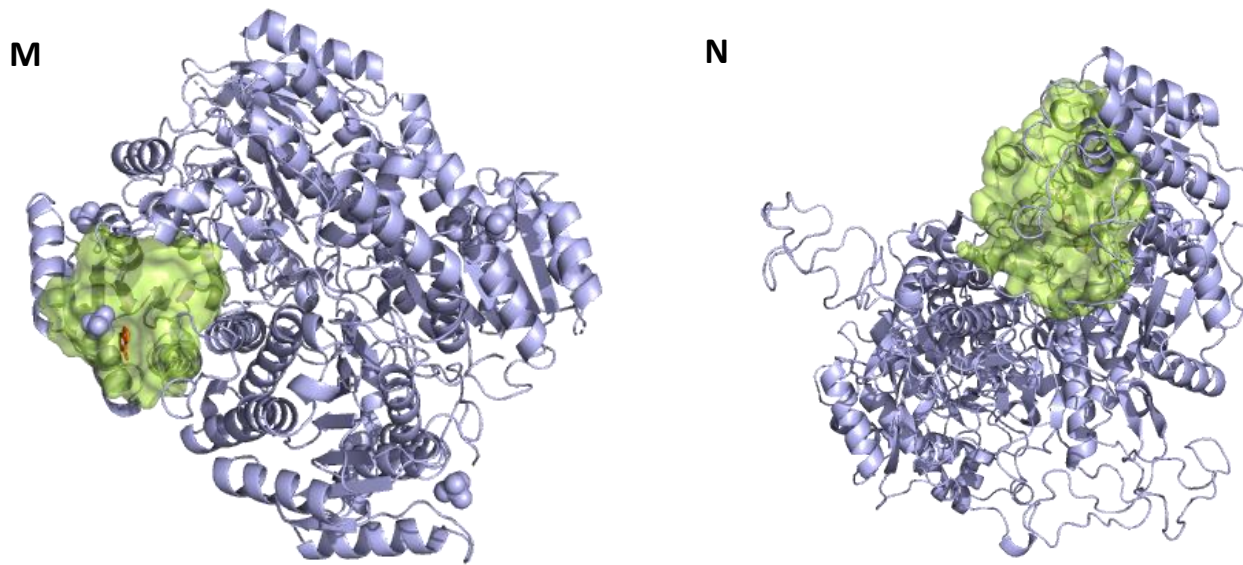


Figura suplementaria 2. Cavidades detectadas con potencial drogable alostéricas al sitio de unión al ligando natural de las 15 enzimas. Cavity drogable asociada al sitio de unión al ligando (verde). (M) Trans-2-enoil-CoA reductasa peroxisomal; (N) C1-tetrahidrofolato sintasa monofuncional, mitocondrial.



Bibliografía

- Ã, G. B. S., & Park, E. (2003). Taurine : new implications for an old amino acid. 226, 195–202. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00611-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00611-6)
- Agostinho, P., Cunha, R. a, & Oliveira, C. (2010). Neuroinflammation , Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer ' s Disease. *Current Pharmaceutical Design*, 16, 2766–2778.
- Allen, N. J., Eroglu, C., Development, F., Studies, B., & Jolla, L. (2018). Cell biology of astrocyte-synapse interactions. *Neuron.*, 96(3), 697–708. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.056>.Cell
- Altenbuchinger, M., Zacharias, H. U., Solbrig, S., Schäfer, A., Büyüközkan, M., Schultheiß, U. T., Kotsis, F., Köttgen, A., Spang, R., Oefner, P. J., Krumsiek, J., & Gronwald, W. (2019). A multi-source data integration approach reveals novel associations between metabolites and renal outcomes in the German Chronic Kidney Disease study. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50346-2>
- Arevalo, M. A., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2015). The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(1), 17–29. <https://doi.org/10.1038/nrn3856>
- Arnedo, M., Ramos, M., Puisac, B., Concepcion, M., Teresa, E., Pie, A., Bueno, G., J., F., Gomez-Puertas, P., & Pie, J. (2011). Mitochondrial HMG–CoA Synthase Deficiency. *Advances in the Study of Genetic Disorders*, February. <https://doi.org/10.5772/22151>
- Asgari, Y., Salehzadeh-Yazdi, A., Schreiber, F., & Masoudi-Nejad, A. (2013). Controllability in cancer metabolic networks according to drug targets as driver nodes. *PLoS ONE*, 8(11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079397>
- Ávila, M., Garcia-segura, L. M., Cabezas, R., Torrente, D., Capani, F., Gonzalez, J., & Barreto, G. E. (2014). Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology Tibolone protects T98G cells from glucose deprivation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 144, 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.07.009>
- Ayyildiz, M., Celiker, S., Ozhelvaci, F., & Akten, E. D. (2020). Identification of Alternative Allosteric Sites in Glycolytic Enzymes for Potential Use as Species-Specific Drug Targets. 7(May), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00088>
- Badaut, J. (2010). Aquaglyceroporin 9 in brain pathologies. *Neuroscience*, 168(4), 1047–1057. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.030>
- Bailey, L. B., & Gregory, J. F. (1999). Recent Advances in Nutritional Science Folate Metabolism and. *The Journal of Nutrition*, 129, 779–782.
- Balog, E. (2014). An Allosteric Signaling Pathway of Human 3- Phosphoglycerate Kinase from Force Distribution Analysis. 10(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003444>
- Balsa, E., Perry, E. A., Bennett, C. F., Jedrychowski, M., Gygi, S. P., Doench, J. G., & Puigserver, P. (2020). Defective NADPH production in mitochondrial disease complex I causes inflammation and cell. *Nature Communications*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16423-1>

- Barinova, K., Khomyakova, E., Semenyuk, P., Schmalhausen, E., & Muronetz, V. (2018). SC. Archives of Biochemistry and Biophysics. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.02.002>
- Basler, G., Grimbs, S., & Ebenho, O. (2012). Evolutionary significance of metabolic network properties. November 2011, 1168–1176.
- Basler, G., & Nikoloski, Z. (2011). JMassBalance: mass-balanced randomization and analysis of metabolic networks. 27(19), 2761–2762. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr448>
- Basler, G., Nikoloski, Z., Larhlimi, A., Barabási, A. L., & Liu, Y. Y. (2016). Control of fluxes in metabolic networks. Genome Research, 26(7), 956–968. <https://doi.org/10.1101/gr.202648.115>
- Becerra-Calixto, A., & Cardona-Gómez, G. P. (2017). The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: Potential in cell therapy. Frontiers in Molecular Neuroscience, 10(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00088>
- Bélanger, M., & Magistretti, P. J. (2009). The role of astroglia in neuroprotection. Dialogues in Clinical Neuroscience, 11(3), 281–296.
- Bidkhor, G., Benfeitas, R., Elmas, E., Kararoudi, M. N., Arif, M., Uhlen, M., Nielsen, J., & Mardinoglu, A. (2018). Metabolic network-based identification and prioritization of anticancer targets based on expression data in hepatocellular carcinoma. Frontiers in Physiology, 9(JUL), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00916>
- Bordbar, A., & Palsson, B. O. (2011). Using the reconstructed genome-scale human metabolic network to study physiology and pathology. 131–141. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2011.02494.x>
- Bordbar, Aarash, Jamshidi, N., & Palsson, B. O. (2011). IAB-RBC-283: A proteomically derived knowledge-base of erythrocyte metabolism that can be used to simulate its physiological and patho-physiological states. BMC Systems Biology, 5, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-110>
- Bordbar, Aarash, Monk, J. M., King, Z. A., & Palsson, B. O. (2014). Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. 15(February), 107–120. <https://doi.org/10.1038/nrg3643>
- Bordel, S., Agren, R., & Nielsen, J. (2010). Sampling the solution space in genome-scale metabolic networks reveals transcriptional regulation in key enzymes. PLoS Computational Biology, 6(7), 16. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000859>
- Brunk, E., Sahoo, S., Zielinski, D. C., Altunkaya, A., Dräger, A., Mih, N., Gatto, F., Nilsson, A., Preciat Gonzalez, G. A., Aurich, M. K., Prlic, A., Sastry, A., Danielsdottir, A. D., Heinken, A., Noronha, A., Rose, P. W., Burley, S. K., Fleming, R. M. T., Nielsen, J., ... Palsson, B. O. (2018). Recon3D enables a three-dimensional view of gene variation in human metabolism. Nature Biotechnology, 36(3), 272–281.

<https://doi.org/10.1038/nbt.4072>

- Burgard, A. P., Nikolaev, E. V., Schilling, C. H., & Maranas, C. D. (2004). Flux Coupling Analysis of Genome-Scale Metabolic Network Reconstructions. *4*, 301–312. <https://doi.org/10.1101/gr.1926504>.
- Burley, S. K., Bhikadiya, C., Bi, C., Bittrich, S., Chen, L., Crichlow, G. V., Christie, C. H., Dalenberg, K., Costanzo, L. Di, Duarte, J. M., Dutta, S., Feng, Z., Ganesan, S., Goodsell, D. S., Ghosh, S., Green, R. K., Guzenko, D., Hudson, B. P., Lawson, C. L., ... Zhuravleva, M. (2021). RCSB Protein Data Bank : powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology , biomedicine , biotechnology , bioengineering and energy sciences. *49*(November 2020), 437–451. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1038>
- Buskila, Y., Bellot-Saez, A., & Morley, J. W. (2019). Generating Brain Waves, the Power of Astrocytes. *Frontiers in Neuroscience*, *13*(October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01125>
- Butland, S. L., Sanders, S. S., Schmidt, M. E., Riechers, S. P., Lin, D. T. S., Martin, D. D. O., Vaid, K., Graham, R. K., Singaraja, R. R., Wanker, E. E., Conibear, E., & Hayden, M. R. (2014). The palmitoyl acyltransferase HIP14 shares a high proportion of interactors with huntingtin: Implications for a role in the pathogenesis of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, *23*(15), 4142–4160. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu137>
- Bylicky, M. A., Mueller, G. P., & Day, R. M. (2018). Mechanisms of endogenous neuroprotective effects of astrocytes in brain injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6501031>
- Cabezas, R., El-Bachá, R. S., González, J., & Barreto, G. E. (2012). Mitochondrial functions in astrocytes: Neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone. *Neuroscience Research*, *74*(2), 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2012.07.008>
- Cammisa, M., Corraera, A., Andreotti, G., & Cubellis, M. V. (2012). Identification and analysis of conserved pockets on protein surfaces. February 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-S7-S9>
- Carta, G., Murru, E., Banni, S., & Manca, C. (2017). Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications. *Frontiers in Physiology*, *8*(NOV), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00902>
- Ceccarelli, S. M., Chomienne, O., Gubler, M., & Arduini, A. (2011). Carnitine Palmitoyltransferase (CPT) Modulators : A Medicinal Chemistry Perspective on 35 Years of Research.
- Chang, R. L., Xie, L., Xie, L., Bourne, P. E., & Palsson, B. (2010). Drug off-target effects predicted using structural analysis in the context of a metabolic network model. *PLoS Computational Biology*, *6*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000938>
- Chaudhry, F. A., Krizaj, D., Larsson, P., Reimer, R. J., Wreden, C., Storm-Mathisen, J.,

- Copenhagen, D., Kavanaugh, M., & Edwards, R. H. (2001). Coupled and uncoupled proton movement by amino acid transport system N. *EMBO Journal*, 20(24), 7041–7051. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7041>
- Chaudhry, F. A., Reimer, R. J., Krizaj, D., Barber, D., Storm-Mathisen, J., Copenhagen, D. R., & Edwards, R. H. (1999). Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell*, 99(7), 769–780. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81674-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81674-8)
- Chen, K., Wu, S., Ye, S., Huang, H., Zhou, Y., & Zhou, H. (2021). Dimethyl Fumarate Induces Metabolic Crisis to Suppress Pancreatic Carcinoma. 12(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.617714>
- Chen, P., Cheng, S., Lin, H., Lee, C., & Chou, C. (2018). Risk Factors for the Progression of Mild Cognitive Impairment in Different Types of Neurodegenerative Disorders. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6929732>
- Coppedè, F. (2021). One-carbon epigenetics and redox biology of neurodegeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, 170(October), 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.002>
- Coppedè, F., Mancuso, M., Siciliano, G., Migliore, L., & Murri, L. (2006). Genes and the environment in neurodegeneration. *Bioscience Reports*, 26(5), 341–367. <https://doi.org/10.1007/s10540-006-9028-6>
- Crespo-Castrillo, A., & Arevalo, M. A. (2020). Microglial and astrocytic function in physiological and pathological conditions: Estrogenic modulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093219>
- Crespo-Castrillo, A., Yanguas-Casás, N., Arevalo, M. A., Azcoitia, I., Barreto, G. E., & Garcia-Segura, L. M. (2018). The Synthetic Steroid Tibolone Decreases Reactive Gliosis and Neuronal Death in the Cerebral Cortex of Female Mice After a Stab Wound Injury. *Molecular Neurobiology*, 55(11), 8651–8667. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1008-x>
- Cummings, J. L., Morstorf, T., & Zhong, K. (2014). *Alzrt269*. 1–7.
- Currais, A., Goldberg, J., Farrokhi, C., Chang, M., Prior, M., Dargusch, R., Daugherty, D., Armando, A., Quehenberger, O., Maher, P., & Schubert, D. (2015). A comprehensive multiomics approach toward understanding the relationship between aging and dementia. *Aging*, 7(11), 937–955. <https://doi.org/10.18632/aging.100838>
- Das, A., Banik, N. L., & Ray, S. K. (2010). Flavonoids Activated Caspases for Apoptosis in Human Glioblastoma T98G and U87MG Cells But Not in Human Normal Astrocytes. 164–176. <https://doi.org/10.1002/cncr.24699>
- David, L., Marashi, S. A., Larhlimi, A., Mieth, B., & Bockmayr, A. (2011). FFCA: A feasibility-based method for flux coupling analysis of metabolic networks. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 236. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-236>

- De Carvalho, C. C. C. R., & Caramujo, M. J. (2018). The various roles of fatty acids. *Molecules*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>
- De Young, G. W., & Keizer, J. (1992). A single-pool inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca^{2+} concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(20), 9895–9899. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9895>
- Devkota, P., & Wuchty, S. (2020). Controllability analysis of molecular pathways points to proteins that control the entire interaction network. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59717-6>
- Dhandapani, K. M., Wade, F. M., Mahesh, V. B., & Brann, D. W. (2005). Astrocyte-derived transforming growth factor- β mediates the neuroprotective effects of 17β -estradiol: Involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology*, 146(6), 2749–2759. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0014>
- Dhote, V., Mandloi, A. S., Singour, P. K., Kawadkar, M., Ganeshpurkar, A., & Jadhav, M. P. (2022). Neuroprotective Effects of Combined Trimetazidine and Progesterone on Cerebral Reperfusion Injury. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 100108. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2022.100108>
- Dilcan, G., Doruker, P., & Demet, E. (2019). binding affinity of alternative conformers of human β 2 - - adrenergic receptor in the presence of intracellular loop 3 (ICL3) and their potential use in virtual screening studies. June 2018, 883–899. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13478>
- Doengi, M., Hirnet, D., Coulon, P., Pape, H., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2009). GABA uptake-dependent Ca^{2+} signaling in developing olfactory bulb astrocytes. 1–6.
- Duarte, N. C., Becker, S. A., Jamshidi, N., Thiele, I., Mo, M. L., Vo, T. D., Srivas, R., & Palsson, B. Ø. (2007). Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data. 104(6).
- Dupuis, J. R., Ruiz-Arce, R., Barr, N. B., Thomas, D. B., & Geib, S. M. (2019). Range-wide population genomics of the Mexican fruit fly: Toward development of pathway analysis tools. *Evolutionary Applications*, 12(8), 1641–1660. <https://doi.org/10.1111/eva.12824>
- Durkee, C. A., & Araque, A. (2019). Diversity and Specificity of Astrocyte–neuron Communication. *Neuroscience*, 396(November), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.11.010>
- Farfa, E. D., & Gallardo, J. M. (2014). Tibolone Prevents Oxidation and Ameliorates Cholinergic Deficit Induced by Ozone Exposure in the Male Rat Hippocampus. 1776–1786. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1385-0>
- Farmer, B. C., Walsh, A. E., Kluemper, J. C., & Johnson, L. A. (2020). Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 14(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00742>

- Fatima, S., Hu, X., Gong, R. H., Huang, C., Chen, M., Wong, H. L. X., Bian, Z., & Kwan, H. Y. (2019). Palmitic acid is an intracellular signaling molecule involved in disease development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(13), 2547–2557. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03092-7>
- Fell, D. A. (2005). Enzymes, metabolites and fluxes. *Journal of Experimental Botany*, 56(410), 267–272. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri011>
- Fellner, L., Irschick, R., Schanda, K., Reindl, M., Klimaschewski, L., Poewe, W., Wenning, G. K., & Stefanova, N. (2013). Toll-like receptor 4 is required for α -synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia*, 61(3), 349–360. <https://doi.org/10.1002/glia.22437>
- Field, M. S., Kamynina, E., Agunloye, O. C., Liebenthal, R. P., Lamarre, S. G., Brosnan, M. E., Brosnan, J. T., & Stover, P. J. (2014). Nuclear enrichment of folate cofactors and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1 (MTHFD1) protect de novo thymidylate biosynthesis during folate deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 289(43), 29642–29650. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.599589>
- Flott, B., & Seifert, W. (1991). Characterization of glutamate uptake systems in astrocyte primary cultures from rat brain. *Glia*, 4(3), 293–304. <https://doi.org/10.1002/glia.440040307>
- Frago, L. M., Canelles, S., Freire-Regatillo, A., Argente-Arizón, P., Barrios, V., Argente, J., Garcia-Segura, L. M., & Chowen, J. A. (2017). Estradiol uses different mechanisms in astrocytes from the hippocampus of male and female rats to protect against damage induced by palmitic acid. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(October), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00330>
- Fumagalli, M., Lecca, D., Abbracchio, M. P., & Ceruti, S. (2017). Pathophysiological role of purines and pyrimidines in neurodevelopment: Unveiling new pharmacological approaches to congenital brain diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 8(DEC), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00941>
- Gelius-Dietrich, G., Desouki, A. A., Fritzemeier, C. J., & Lercher, M. J. (2013). Sybil - Efficient constraint-based modelling in R. *BMC Systems Biology*, 7(November). <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-125>
- Gianchandani, E. P., Chavali, A. K., & Papin, J. A. (2010). The application of flux balance analysis in systems biology. <https://doi.org/10.1002/wsbm.60>
- Gille, C., Bölling, C., Hoppe, A., Bulik, S., Hoffmann, S., Hübner, K., Karlstädt, A., Ganeshan, R., König, M., Rother, K., Weidlich, M., Behre, J., & Holzhütter, H. G. (2010). HepatoNet1: A comprehensive metabolic reconstruction of the human hepatocyte for the analysis of liver physiology. *Molecular Systems Biology*, 6(411). <https://doi.org/10.1038/msb.2010.62>
- González-giraldo, Y., Forero, D. A., Echeverria, V., Garcia-segura, L. M., & Barreto, G. E. (2019). Molecular and Cellular Endocrinology Tibolone attenuates in inflammatory

- response by palmitic acid and preserves mitochondrial membrane potential in astrocytic cells through estrogen receptor beta. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 486(February), 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.02.017>
- González, J., Pinzón, A., Angarita-Rodríguez, A., Aristizabal, A. F., Barreto, G. E., & Martín-Jiménez, C. (2020). Advances in Astrocyte Computational Models: From Metabolic Reconstructions to Multi-omic Approaches. *Frontiers in Neuroinformatics*, 14(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fninf.2020.00035>
- Greener, J. G., & Sternberg, M. J. E. (2015). AlloPred : prediction of allosteric pockets on proteins using normal mode perturbation analysis. 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0771-1>
- Gu, C., Kim, G. B., Kim, W. J., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2019). Current status and applications of genome-scale metabolic models. *Genome Biology*, 20(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1730-3>
- Guilloux, V. Le, Schmidtke, P., & Tuffery, P. (2009). Fpocket : An open source platform for ligand pocket detection. February. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-168>
- Gulsen, M., Yesilova, Z., Bagci, S., Uygun, A., Ozcan, A., Ercin, C. N., Erdil, A., Sanisoglu, S. Y., Ates, Y., Erbil, M. K., Karaeren, N., & Dagalp, K. (2005). Elevated plasma homocysteine concentrations as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. October 2004, 1448–1455. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2005.03891.x>
- Guo, W. F., Zhang, S. W., Shi, Q. Q., Zhang, C. M., Zeng, T., & Chen, L. (2018). A novel algorithm for finding optimal driver nodes to target control complex networks and its applications for drug targets identification. *BMC Genomics*, 19(Suppl 1). <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4332-z>
- Gupta, M., Sharma, R., & Kumar, A. (2018). Docking techniques in pharmacology: How much promising? *Computational Biology and Chemistry*, 76, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.06.005>
- Han, X., Zhang, T., Liu, H., Mi, Y., & Gou, X. (2020). Astrocyte Senescence and Alzheimer's Disease: A Review. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00148>
- Haroon, E., Miller, A. H., & Sanacora, G. (2017). Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 193–215. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.199>
- Hashimoto, M., & Hossain, S. (2018). Fatty Acids: From Membrane Ingredients to Signaling Molecules. *Biochemistry and Health Benefits of Fatty Acids*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80430>
- Herculano-Houzel, S., & Dos Santos, S. (2018). You Do Not Mess with the Glia. *Neuroglia*, 1(1), 193–219. <https://doi.org/10.3390/neuroglia1010014>

- Hidalgo-lanussa, O., Ávila-rodriguez, M., Baez-jurado, E., Zamudio, J., Echeverria, V., Garcia-segura, L. M., Barreto, G. E., & Garcia-segura, L. M. (2017). Tibolone Reduces Oxidative Damage and Inflammation in Microglia Stimulated with Palmitic Acid through Mechanisms Involving Estrogen Receptor Beta. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0777-y>
- Hidalgo-Lanussa, O., Baez-Jurado, E., Echeverria, V., Ashraf, G. M., Sahebkar, A., Garcia-Segura, L. M., Melcangi, R. C., & Barreto, G. E. (2020). Lipotoxicity, neuroinflammation, glial cells and oestrogenic compounds. *Journal of Neuroendocrinology*, 32(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/jne.12776>
- Hilton, B. J., Lang, B. T., & Cregg, J. M. (2012). Keratan Sulfate Proteoglycans in Plasticity and Recovery after Spinal Cord Injury. 32(13), 4331–4333. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0333-12.2012>
- Höfer, T., Venance, L., & Giaume, C. (2002). Control and Plasticity of Intercellular Calcium Waves in Astrocytes: A Modeling Approach. *Journal of Neuroscience*, 22(12), 4850–4859. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-12-04850.2002>
- Hood, L., & Friend, S. H. (2011). Predictive, personalized, preventive, participatory (P4) cancer medicine. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(3), 184–187. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.227>
- Hood, L., Heath, J. R., Phelps, M. E., & Lin, B. (2004). Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. *Science*, 306(5696), 640–643. <https://doi.org/10.1126/science.1104635>
- Hornak, V., Okur, A., Rizzo, R. C., & Simmerling, C. (2006). HIV-1 Protease Flaps Spontaneously Close to the Correct Structure in Simulations Following Manual Placement of an Inhibitor into the Open State. 2812–2813.
- Hu, X., Zhu, X., Yu, W., Zhang, Y., Yang, K., & Liu, Z. (2022). *European Journal of Medicinal Chemistry Reports A mini review of small-molecule inhibitors targeting palmitoyltransferases*. 5(August 2021).
- Huang, J., Hou, J., Li, L., & Wang, Y. (2020). Flux balance analysis of glucose degradation by anaerobic digestion in negative pressure. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(51), 26822–26830. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.07.053>
- Huang, Y. N., Lai, C. C., Chiu, C. T., Lin, J. J., & Wang, J. Y. (2014). L-ascorbate attenuates the endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation and NF- κ B translocation in cortical neurons/glia cocultures. *PLoS ONE*, 9(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097276>
- Hyduke, D., Hyduke, D., Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R., Thiele, I., Orth, J., Feist, A., Zielinski, D., Bordbar, A., Lewis, N., Rahmanian, S., Kang, J., & Palsson, B. (2011). COBRA Toolbox 2.0. *Protocol Exchange*, May, 0–1. <https://doi.org/10.1038/protex.2011.234>

- Ipata, P. L., & Tozzi, M. G. (2006). Recent advances in structure and function of cytosolic IMP-GMP specific 5'-nucleotidase II (cN-II). *Purinergic Signalling*, 2(4), 669–675. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9009-z>
- Ito, Z., Sakamoto, K., Imagama, S., Matsuyama, Y., Zhang, H., Hirano, K., Ando, K., Yamashita, T., Ishiguro, N., & Kadomatsu, K. (2010). N -Acetylglucosamine 6- O -Sulfotransferase-1-Deficient Mice Show Better Functional Recovery after Spinal Cord Injury. 30(17), 5937–5947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2570-09.2010>
- Jacobs, A. H., & Tavitian, B. (2012). Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(7), 1393–1415. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.53>
- Jarugumilli, G., Chen, B., & Wu, X. (n.d.). Chemical Probes to Directly Profile Palmitoleoylation of Proteins.
- Jendoubi, T. (2021). Approaches to integrating metabolomics and multi-omics data: A primer. *Metabolites*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/metabo11030184>
- Jiang, P., Wang, H., Li, W., Zang, C., Li, B., Wong, Y. J., Meyer, C., Liu, J. S., Aster, J. C., & Liu, X. S. (2015). Network analysis of gene essentiality in functional genomics experiments. *Genome Biology*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0808-9>
- Jones, L. L., & Tuszynski, M. H. (2002). Spinal Cord Injury Elicits Expression of Keratan Sulfate Proteoglycans by Macrophages, Reactive Microglia, and Oligodendrocyte Progenitors. *Journal of Neuroscience*, 22(11), 4611–4624. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-11-04611.2002>
- Kanhaiya, K. (2020). Target Controllability of Cancer Networks. Åbo Akademi University, 1, 1–68.
- Karahalil, B. (2017). Overview of Systems Biology and Omics Technologies Overview of Systems Biology and Omics Technologies. September 2016. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160926>
- Kawabata, T. (2009). Detection of multiscale pockets on protein surfaces using mathematical morphology. 1195–1211. <https://doi.org/10.1002/prot.22639>
- Kim, M., Rai, N., Zorraquino, V., & Tagkopoulos, I. (2016). state in unexplored conditions for *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms13090>
- Kim, Y., Park, J., & Choi, Y. K. (2019). The role of astrocytes in the central nervous system focused on BK channel and heme oxygenase metabolites: A review. *Antioxidants*, 8(5), 7–13. <https://doi.org/10.3390/antiox8050121>
- Kohl, P., Crampin, E. J., Quinn, T. A., & Noble, D. (2010). Systems biology: An approach. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 88(1), 25–33. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.92>

- Larhlimi, A., David, L., Selbig, J., & Bockmayr, A. (2012). F2C2: a fast tool for the computation of flux coupling in genome-scale metabolic networks.
- Le Foll, C., & Levin, B. E. (2016). Fatty acid-induced astrocyte ketone production and the control of food intake. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 310(11), R1186–R1192. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00113.2016>
- Leanza, L., Ferraro, P., Reichard, P., & Bianchi, V. (2008). Metabolic interrelations within guanine deoxynucleotide pools for mitochondrial and nuclear DNA maintenance. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16437–16445. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801572200>
- Lee, W., Reyes, R. C., Gottipati, M. K., Lewis, K., Lesort, M., Parpura, V., & Gray, M. (2013). Enhanced Ca²⁺-dependent glutamate release from astrocytes of the BACHD Huntington's disease mouse model. *Neurobiology of Disease*, 58, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.06.002>
- Lewis, N. E., & Abdel-Haleem, A. M. (2013). The evolution of genome-scale models of cancer metabolism. *Frontiers in Physiology*, 4 SEP(September), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00237>
- Lewis, N. E., Nagarajan, H., & Palsson, B. O. (2012). Constraining the metabolic genotype-phenotype relationship using a phylogeny of in silico methods. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 291–305. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2737>
- Li, J., Wei, Z., Zheng, M., Gu, X., Deng, Y., Qiu, R., Chen, F., Ji, C., Gong, W., Xie, Y., & Mao, Y. (2006). Crystal Structure of Human Guanosine Monophosphate Reductase 2 (GM₂PR2) in Complex with GMP. *Journal of Molecular Biology*, 368(2), 980–988. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.047>
- Li, K., Li, J., Zheng, J., & Qin, S. (2019). Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging and Disease*, 10(3), 664. <https://doi.org/10.14336/ad.2018.0720>
- Li, X., Li, M., Tian, L., Chen, J., Liu, R., & Ning, B. (2020). Review Article Reactive Astrogliosis: Implications in Spinal Cord Injury Progression and Therapy. 2020.
- Li, Y. X., & Rinzel, J. (1994). Equations for InsP₃ receptor-mediated [Ca²⁺]_i oscillations derived from a detailed kinetic model: A Hodgkin-Huxley like formalism. In *Journal of Theoretical Biology* (Vol. 166, Issue 4, pp. 461–473). <https://doi.org/10.1006/jtbi.1994.1041>
- Liu, H., Luo, K., & Luo, D. (2018). Guanosine monophosphate reductase 1 is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, November 2017, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21256-6>
- Liu, X., & Pan, L. (2014). Detection of driver metabolites in the human liver metabolic network using structural controllability analysis. *BMC Systems Biology*, 8(1), 1–17.

<https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-51>

- Liu, Y. Y., Slotine, J. J., & Barabási, A. L. (2011). Controllability of complex networks. *Nature*, 473(7346), 167–173. <https://doi.org/10.1038/nature10011>
- Luterman, J. D., Haroutunian, V., Yemul, S., Ho, L., Purohit, D., Aisen, P. S., Mohs, R., & Pasinetti, G. M. (2000). Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia. *Archives of Neurology*, 57(8), 1153–1160. <https://doi.org/10.1001/archneur.57.8.1153>
- Ma, H., & Zhao, H. (2013). Drug target inference through pathway analysis of genomics data. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(7), 966–972. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.12.004>
- Maarleveld, T. R., Khandelwal, R. A., Olivier, B. G., Teusink, B., & Bruggeman, F. J. (2013). Basic concepts and principles of stoichiometric modeling of metabolic networks. *Biotechnology Journal*, 8(9), 997–1008. <https://doi.org/10.1002/biot.201200291>
- Mahmoud, S., Gharagozloo, M., Simard, C., & Gris, D. (2019). Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. 1–27. <https://doi.org/10.3390/cells8020184>
- Manninen, T., Havela, R., & Linne, M.-L. (2019). Computational Models of Astrocytes and Astrocyte–Neuron Interactions: Characterization, Reproducibility, and Future Perspectives (pp. 423–454). https://doi.org/10.1007/978-3-030-00817-8_16
- Mardinoglu, A., Agren, R., Kampf, C., Asplund, A., Nookaew, I., Jacobson, P., Walley, A. J., Froguel, P., Carlsson, L. M., Uhlen, M., & Nielsen, J. (2013). Integration of clinical data with a genome-scale metabolic model of the human adipocyte. *Molecular Systems Biology*, 9(649), 1–16. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.5>
- Mardinoglu, A., Agren, R., Kampf, C., Asplund, A., Uhlen, M., & Nielsen, J. (2014). non-alcoholic fatty liver disease. *Nature Communications*, 5(May 2013), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms4083>
- Martín-Jiménez, C. A., Salazar-Barreto, D., Barreto, G. E., & González, J. (2017). Genome-scale reconstruction of the human astrocyte metabolic network. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9(FEB), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00023>
- Martin-jiménez, C., & González, J. (2020). Tibolone Ameliorates the Lipotoxic Effect of Palmitic Acid in Normal Human Astrocytes.
- Martinen, M., Paananen, J., Neme, A., Mitra, V., Takalo, M., Natunen, T., Paldanius, K. M. A., Mäkinen, P., Bremang, M., Kurki, M. I., Rauramaa, T., Leinonen, V., Soininen, H., Haapasalo, A., Pike, I., & Hiltunen, M. (2019). A multiomic approach to characterize the temporal sequence in Alzheimer’s disease-related pathology. *Neurobiology of Disease*, 124, 454–468. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.12.009>
- Masid, M., Ataman, M., & Hatzimanikatis, V. (2020). Analysis of human metabolism by reducing the complexity of the genome-scale models using redHUMAN. *Nature*

- Communications, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16549-2>
- Matias, I., Morgado, J., & Gomes, F. C. A. (2019). Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11(March), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00059>
- Matyash, V., & Kettenmann, H. (2009). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.12.001>
- McCloskey, D., Palsson, B., & Feist, A. M. (2013). Basic and applied uses of genome-scale metabolic network reconstructions of *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.18>
- Melo, H. M., Santos, L. E., & Ferreira, S. T. (2019). Diet-Derived Fatty Acids, Brain Inflammation, and Mental Health. *Frontiers in Neuroscience*, 13(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00265>
- Menara, T., Bianchin, G., Innocenti, M., & Pasqualetti, F. (2017). On the number of strongly structurally controllable networks. *Proceedings of the American Control Conference*, 340–345. <https://doi.org/10.23919/ACC.2017.7962976>
- Michael Hay, David W Thomas, John L Craighead, C. E. & J. R. (2009). Clinical development success rates for investigational drugs. *Gastrointestinal Cancer Research*, 3(1), 20–28.
- Modelska, K., & Cummings, S. (2015). CLINICAL REVIEW 140 Tibolone for Postmenopausal Women : Systematic Review of Randomized Trials. 87(November), 16–23.
- Moncada, S. & Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, 329, 2002–2012.
- Nagelhus, E. A., & Ottersen, O. P. (2013). Physiological roles of Aquaporin-4 in brain. *Physiological Reviews*, 93(4), 1543–1562. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2013>
- Nielsen, J. (2017a). Systems Biology of Metabolism: A Driver for Developing Personalized and Precision Medicine. *Cell Metabolism*, 25(3), 572–579. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.02.002>
- Nielsen, J. (2017b). Systems Biology of Metabolism: A Driver for Developing Personalized and Precision Medicine. *Cell Metabolism*, 25(3), 572–579. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.02.002>
- Nielsen, J. (2017c). Systems Biology of Metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 245–275. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044757>
- Niu, Y. C., Feng, R. N., Hou, Y., Li, K., Kang, Z., Wang, J., Sun, C. H., & Li, Y. (2012). Histidine and arginine are associated with inflammation and oxidative stress in obese women. *British Journal of Nutrition*, 108(1), 57–61.

<https://doi.org/10.1017/S0007114511005289>

- Nurse, P., & Hayles, J. (2011). The cell in an era of systems biology. *Cell*, 144(6), 850–854. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.045>
- Nussinov, R., & Tsai, C. (2013). Review Allosterity in Disease and in Drug Discovery. *Cell*, 153(2), 293–305. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.034>
- Oliveira, A. de A. B., Melo, N. de F. M., Vieira, É. dos S., Nogueira, P. A. S., Coope, A., Velloso, L. A., Dezonne, R. S., Ueira-Vieira, C., Botelho, F. V., Gomes, J. de A. S., & Zanon, R. G. (2018). Palmitate treated-astrocyte conditioned medium contains increased glutathione and interferes in hypothalamic synaptic network in vitro. *Neurochemistry International*, 120, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.08.010>
- Orth, J. D., Conrad, T. M., Na, J., Lerman, J. A., Nam, H., Feist, A. M., & Palsson, B. (2011). A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism-2011. *Molecular Systems Biology*, 7(535), 1–9. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.65>
- Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. O. (2010). What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology*, 28(3), 245–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.1614>
- Ortiz-Rodriguez, A., Acáz-Fonseca, E., Boya, P., Arevalo, M. A., & Garcia-Segura, L. M. (2019). Lipotoxic Effects of Palmitic Acid on Astrocytes Are Associated with Autophagy Impairment. *Molecular Neurobiology*, 56(3), 1665–1680. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1183-9>
- Ortiz-Rodriguez, A., & Arevalo, M. A. (2020). The contribution of astrocyte autophagy to systemic metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072479>
- Osorio, D., Botero, K., Gonzalez, J., and Pinzon, A. (2016). “exp2flux” Convierte datos de Gene EXPression a FBA FLUXes. Package Version 0.1. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.14401.56168>
- Osorio, D., Pinzón, A., Martín-Jiménez, C., Barreto, G. E., & González, J. (2020a). Multiple Pathways Involved in Palmitic Acid-Induced Toxicity: A System Biology Approach. *Frontiers in Neuroscience*, 13(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01410>
- Osorio, D., Pinzón, A., Martín-Jiménez, C., Barreto, G. E., & González, J. (2020b). Multiple Pathways Involved in Palmitic Acid-Induced Toxicity: A System Biology Approach. *Frontiers in Neuroscience*, 13(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01410>
- Palsson, B. (2009). Metabolic systems biology. *FEBS Letters*, 583(24), 3900–3904. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.09.031>
- Pandey, V., Gardiol, D. H., & Chiappino-pepe, A. (2019). Running head : TEX-FBA TEX-FBA : A constraint-based method for integrating gene expression , thermodynamics ,

- and metabolomics data into genome-scale metabolic models 1 Laboratory of Computational Systems Biotechnology , École Polytechnique Fédérale de La. 1–30.
- Papin, J. A., Hunter, T., Palsson, B. O., & Subramaniam, S. (2005). Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(2), 99–111. <https://doi.org/10.1038/nrm1570>
- Paraiso, W. K. D., Garcia-chica, J., Ariza, X., Zagmutt, S., Fukushima, S., Garcia, J., Mochida, Y., Serra, D., Herrero, L., Kinoh, H., Casals, N., Kataoka, K., Rodríguez-rodríguez, R., & Quader, S. (2021). Biomaterials Science conjugated CPT1A inhibitors to modulate lipid metabolism in brain cells †. <https://doi.org/10.1039/d1bm00689d>
- Pardo, B., Contreras, L., & Satrústegui, J. (2013). De novo Synthesis of Glial Glutamate and Glutamine in Young Mice Requires Aspartate Provided by the Neuronal Mitochondrial Aspartate-Glutamate Carrier Aralar/AGC1. *Frontiers in Endocrinology*, 4(October), 15–18. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00149>
- Patil, S., Melrose, J., & Chan, C. (2007). Involvement of astroglial ceramide in palmitic acid-induced Alzheimer-like changes in primary neurons. *European Journal of Neuroscience*, 26(8), 2131–2141. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05797.x>
- Patil, S., Sheng, L., Masserang, A., & Chan, C. (2006). Palmitic acid-treated astrocytes induce BACE1 upregulation and accumulation of C-terminal fragment of APP in primary cortical neurons. *Neuroscience Letters*, 406(1–2), 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.07.015>
- Peracchi, A., & Mozzarelli, A. (2011). *Biochimica et Biophysica Acta Exploring and exploiting allostery : Models , evolution , and drug targeting* ☆. *BBA - Proteins and Proteomics*, 1814(8), 922–933. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.10.008>
- Piccolis, M., Bond, L. M., Kampmann, M., Pulimeno, P., Chitraju, C., Jayson, C. B. K., Vaites, L. P., Boland, S., Lai, Z. W., Gabriel, K. R., Elliott, S. D., Paulo, J. A., Harper, J. W., Weissman, J. S., Walther, T. C., & Farese, R. V. (2019). Probing the Global Cellular Responses to Lipotoxicity Caused by Saturated Fatty Acids. *Molecular Cell*, 74(1), 32–44.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.036>
- Pietzke, M., Meiser, J., & Vazquez, A. (2020). Formate metabolism in health and disease. *Molecular Metabolism*, 33(xxxx), 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.05.012>
- Pinu, F. R., Beale, D. J., Paten, A. M., Kouremenos, K., Swarup, S., Schirra, H. J., & Wishart, D. (2019). Systems biology and multi-omics integration: Viewpoints from the metabolomics research community. *Metabolites*, 9(4), 1–31. <https://doi.org/10.3390/metabo9040076>
- Price, N. D., Reed, J. L., & Palsson, B. (2004). Genome-scale models of microbial cells: Evaluating the consequences of constraints. *Nature Reviews Microbiology*, 2(11), 886–897. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1023>
- Ramon, C., Gollub, M. G., & Stelling, J. (2018). Integrating -omics data into genome-scale

- metabolic network models: Principles and challenges. *Essays in Biochemistry*, 62(4), 563–574. <https://doi.org/10.1042/EBC20180011>
- Ravindran, V., Nacher, J. C., Akutsu, T., Ishitsuka, M., Osadcenco, A., Sunitha, V., Bagler, G., Schwartz, J. M., & Robertson, D. L. (2019). Network controllability analysis of intracellular signalling reveals viruses are actively controlling molecular systems. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38224-9>
- Rezola, A., Pey, J., Tobalina, L., Rubio, Á., Beasley, J. E., & Planes, F. J. (2015). Advances in network-based metabolic pathway analysis and gene expression data integration. *Briefings in Bioinformatics*, 16(2), 1–15. <https://doi.org/10.1093/bib/bbu009>
- Robertson, J. M. (2018). The gliocentric brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19103033>
- Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., ... Kavukcuoglu, K. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *May*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Rose, J., Brian, C., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., & Franco, R. (2020). Mitochondrial Metabolism in Astrocytes Regulates Brain Bioenergetics, Neurotransmission and Redox Balance. *Frontiers in Neuroscience*, 14(November), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.536682>
- Sajitz-Hermstein, M., & Nikoloski, Z. (2013). Structural Control of Metabolic Flux. *PLoS Computational Biology*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003368>
- Salvatore, D., Bartha, T., & Larsen, P. R. (1998). The Guanosine Monophosphate Reductase Gene Is Conserved in Rats and Its Expression Increases Rapidly in Brown Adipose Tissue during Cold Exposure *. *Journal of Biological Chemistry*, 273(47), 31092–31096. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.47.31092>
- Schafer, J. R. A., Fell, D. A., Rothman, D., & Shulman, R. G. (2004). Protein phosphorylation can regulate metabolite concentrations rather than control flux: The example of glycogen synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(6), 1485–1490. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307299101>
- Schousboe, A., Bak, L. K., & Waagepetersen, H. S. (2013). Astrocytic control of biosynthesis and turnover of the neurotransmitters glutamate and GABA. *Frontiers in Endocrinology*, 4(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00102>
- Schrödinger, L. (2015). The {PyMOL} Molecular Graphics System, Version~2.4. February. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33676.64641>
- Schuetz, R., Kuepfer, L., & Sauer, U. (2007). Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, 3(119). <https://doi.org/10.1038/msb4100162>

- Schwartz, J. M., Otokuni, H., Akutsu, T., & Nacher, J. C. (2019). Probabilistic controllability approach to metabolic fluxes in normal and cancer tissues. *Nature Communications*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10616-z>
- Segrè, D., Vitkup, D., & Church, G. M. (2002). Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), 15112–15117. <https://doi.org/10.1073/pnas.232349399>
- Sertbaş, M., Ülgen, K., & Çakir, T. (2014). Systematic analysis of transcription-level effects of neurodegenerative diseases on human brain metabolism by a newly reconstructed brain-specific metabolic network. *FEBS Open Bio*, 4, 542–553. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.05.006>
- Shi, L. F., Zhang, Q., Shou, X. Y., & Niu, H. J. (2021). Expression and prognostic value identification of methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 (Mthfd2) in brain low-grade glioma. *International Journal of General Medicine*, 14, 4517–4527. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S323858>
- Shlomi, T., Berkman, O., & Ruppin, E. (2005). Regulatory on/off minimization of metabolic flux. *Pnas*, 102(21), 7695–7700. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406346102>
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 24(8), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>
- Singh, D., & Lercher, M. J. (2020). Network reduction methods for genome-scale metabolic models. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(3), 481–488. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03383-z>
- Siracusa, R., Fusco, R., & Cuzzocrea, S. (2019). Astrocytes: Role and functions in brain pathologies. *Frontiers in Pharmacology*, 10(SEP), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01114>
- Sofroniew M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neuroscience*, 32(12), 638–647. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>
- Sofroniew, J. E. B. and M. V. (2015). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81(2), 229–248. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.034>
- Sofroniew, M. V. (2014). Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *Neuroscientist*, 20(2), 160–172. <https://doi.org/10.1177/1073858413504466>
- Son, D. O., Satsu, H., & Shimizu, M. (2005). Histidine inhibits oxidative stress- and TNF- α -induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *579*, 4671–4677. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.038>
- Sonnefeld, U., Akiho, H., Koshiya, K., & Iwai, A. (1998). Effect of orotic acid on the

- metabolism of cerebral cortical astrocytes during hypoxia and reoxygenation: An NMR spectroscopy study. *Journal of Neuroscience Research*, 51(1), 103–108. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19980101\)51:1<103::AID-JNR11>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19980101)51:1<103::AID-JNR11>3.0.CO;2-C)
- Souders, C. L., Zubcevic, J., & Martyniuk, C. J. (2021). Tumor Necrosis Factor Alpha and the Gastrointestinal Epithelium: Implications for the Gut-Brain Axis and Hypertension. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01044-z>
- Souza, D. G., Almeida, R. F., Souza, D. O., & Zimmer, E. R. (2019). The astrocyte biochemistry. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 95(April), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.04.002>
- Stank, A., Kokh, D. B., Fuller, J. C., & Wade, R. C. (2016). Protein Binding Pocket Dynamics. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00516>
- Suthers, P. F., Zomorodi, A., & Maranas, C. D. (2009). Genome-scale gene/reaction essentiality and synthetic lethality analysis. *Molecular Systems Biology*, 5(301), 1–17. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.56>
- Sweetlove, L. J., & George Ratcliffe, R. (2011). Flux-balance modeling of plant metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 2(AUG), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00038>
- Terzer, M., & Stelling, J. (2008). Large-scale computation of elementary flux modes with bit pattern trees. *Bioinformatics*, 24(19), 2229–2235. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn401>
- Thiele, I., Swainston, N., Fleming, R. M. T., Hoppe, A., Sahoo, S., Aurich, M. K., Haraldsdottir, H., Mo, M. L., Rolfsson, O., Stobbe, M. D., Thorleifsson, S. G., Agren, R., Bölling, C., Bordel, S., Chavali, A. K., Dobson, P., Dunn, W. B., Endler, L., Hala, D., ... Palsson, B. O. (2013a). A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nature Biotechnology*, 31(5), 419–425. <https://doi.org/10.1038/nbt.2488>
- Thiele, I., Swainston, N., Fleming, R. M. T., Hoppe, A., Sahoo, S., Aurich, M. K., Haraldsdottir, H., Mo, M. L., Rolfsson, O., Stobbe, M. D., Thorleifsson, S. G., Agren, R., Bölling, C., Bordel, S., Chavali, A. K., Dobson, P., Dunn, W. B., Endler, L., Hala, D., ... Palsson, B. O. (2013b). A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nature Biotechnology*, 31(5), 419–425. <https://doi.org/10.1038/nbt.2488>
- Tong, X., Ao, Y., Faas, G. C., Nwaobi, S. E., Xu, J., Haustein, M. D., Anderson, M. A., Mody, I., Olsen, M. L., Sofroniew, M. V., & Khakh, B. S. (2014). Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nature Neuroscience*, 17(5), 694–703. <https://doi.org/10.1038/nn.3691>
- Trott, O. and Olson, A. J. (2011). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Ussher, J. R., Keung, W., Fillmore, N., Koves, T. R., Mori, J., Zhang, L., Lopaschuk, D. G.,

- Ilkayeva, O. R., Wagg, C. S., Jaswal, J. S., Muoio, D. M., & Lopaschuk, G. D. (2014). Treatment with the 3-Ketoacyl-CoA Thiolase Inhibitor Trimetazidine Does Not Exacerbate Whole-Body Insulin Resistance in Obese Mice. *June*, 487–496.
- Valenza, G., Pioggia, G., Armato, A., Ferro, M., Scilingo, E. P., & De Rossi, D. (2011). A neuron-astrocyte transistor-like model for neuromorphic dressed neurons. *Neural Networks*, 24(7), 679–685. <https://doi.org/10.1016/j.neunet.2011.03.013>
- Verkhratsky, A., and Nedergaard, M. (2018). PHYSIOLOGY OF ASTROGLIA. *Physiol. Rev.* 98, 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Verkhratsky, A., & Butt, A. (2018). The History of the Decline and Fall of the Glial Numbers Legend. *Neuroglia*, 1(1), 188–192. <https://doi.org/10.3390/neuroglia1010013>
- Vicente-Gutierrez, C., Bonora, N., Bobo-Jimenez, V., Jimenez-Blasco, D., Lopez-Fabuel, I., Fernandez, E., Josephine, C., Bonvento, G., Enriquez, J. A., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2019). Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour. *Nature Metabolism*, 1(2), 201–211. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0031-6>
- Voillet, V., Besse, P., Liaubet, L., Cristobal, M. S., & González, I. (2016). Handling missing rows in multi-omics data integration : multiple imputation in multiple factor analysis framework. *BMC Bioinformatics*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1273-5>
- Volkamer, A., Kuhn, D., Rippmann, F., & Rarey, M. (2012). DoGSiteScorer : a web server for automatic binding site prediction , analysis and druggability assessment. 28(15), 2074–2075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts310>
- Volterra, A., & Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(8), 626–640. <https://doi.org/10.1038/nrn1722>
- Wang, W., Jiang, Z., Hu, C., Chen, C., Hu, Z., Wang, A., Wang, L., & Liu, J. (2020). Pharmacologically inhibiting phosphoglycerate kinase 1 for glioma with NG52. *Acta Pharmacologica Sinica*, July. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0465-8>
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics in Western Equatoria State. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., Beer, T. A. P. De, Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL : homology modelling of protein structures and complexes. May, 1–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wong, K. L., Wu, Y. R., Cheng, K. S., Chan, P., Cheung, C. W., Lu, D. Y., Su, T. H., Liu, Z. M., & Leung, Y. M. (2014a). Palmitic acid-induced lipotoxicity and protection by (+)-catechin in rat cortical astrocytes. *Pharmacological Reports*, 66(6), 1106–1113. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.07.009>
- Wong, K. L., Wu, Y. R., Cheng, K. S., Chan, P., Cheung, C. W., Lu, D. Y., Su, T. H., Liu, Z.

- M., & Leung, Y. M. (2014b). Palmitic acid-induced lipotoxicity and protection by (+)-catechin in rat cortical astrocytes. *Pharmacological Reports*, 66(6), 1106–1113. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.07.009>
- Wörheide, M. A., Krumsiek, J., Kastenmüller, G., & Arnold, M. (2021). Multi-omics integration in biomedical research – A metabolomics-centric review. *Analytica Chimica Acta*, 1141, 144–162. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.10.038>
- Wu, Z., Li, W., Liu, G., & Tang, Y. (2018). Network-Based Methods for Prediction of Drug-Target Interactions. 9(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01134>
- Wuchty, S. (2019). Controllability of molecular pathways. *BioRxiv*, 560375. <https://doi.org/10.1101/560375>
- Xia, C., Fu, Z., Battaile, K. P., & Kim, J. P. (2019). Crystal structure of human mitochondrial trifunctional protein, a fatty acid β -oxidation metabolon. 116(13), 6069–6074. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816317116>
- Xiao, Q., Yan, P., Ma, X., Liu, H., Perez, R., Zhu, A., Gonzales, E., Burchett, J. M., Schuler, D. R., Cirrito, J. R., Diwan, A., & Lee, J. M. (2014). Enhancing astrocytic lysosome biogenesis facilitates A β clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. *Journal of Neuroscience*, 34(29), 9607–9620. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3788-13.2014>
- Xu, Y., Wang, S., Hu, Q., Gao, S., Ma, X., Zhang, W., Shen, Y., Chen, F., Lai, L., Pei, J., & Cavpharmer, C. (2018). CavityPlus: a web server for protein cavity detection with pharmacophore modelling, allosteric site identification and covalent ligand binding ability prediction. 46(May), 374–379. <https://doi.org/10.1093/nar/gky380>
- Yang, M., & Vousden, K. H. (2016). Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(10), 650–662. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.81>
- Yang, S. Y., He, X. Y., & Schulz, H. (1987). Fatty acid oxidation in rat brain is limited by the low activity of 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(27), 13027–13032. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)45161-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)45161-7)
- Yin, K. (2015). Positive correlation between expression level of mitochondrial serine hydroxymethyltransferase and breast cancer grade. *OncoTargets and Therapy*, 8, 1069–1074. <https://doi.org/10.2147/OTT.S82433>
- Ying, L., Tippetts, T. S., & Chaurasia, B. (2019). Ceramide dependent lipotoxicity in metabolic diseases. *Nutrition and Healthy Aging*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.3233/NHA-170032>
- Young, F. B., Butland, S. L., Sanders, S. S., Sutton, L. M., & Hayden, M. R. (2012). Putting proteins in their place: Palmitoylation in Huntington disease and other neuropsychiatric diseases. *Progress in Neurobiology*, 97(2), 220–238. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.11.002>
- Yousofshahi, M., Ullah, E., Stern, R., & Hassoun, S. (2013). MC3: A steady-state model and

- constraint consistency checker for biochemical networks. *BMC Systems Biology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-129>
- Yu, J., Zhou, Y., Tanaka, I., & Yao, M. (2010). Roll : a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere. 26(1), 46–52. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp599>
- Yuan, Z., Zhao, C., Di, Z., Wang, W. X., & Lai, Y. C. (2013). Exact controllability of complex networks. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3447>
- Zahra, W., Rai, S. N., Birla, H., Singh, S. Sen, Rathore, A. S., Dilnashin, H., Keswani, C., & Singh, S. P. (2019). Economic importance of medicinal plants in Asian countries. In *Bioeconomy for Sustainable Development*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9431-7_19
- Zhang, H., Muramatsu, T., Murase, A., Yuasa, S., Uchimura, K., & Kadomatsu, K. (2006). N-Acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1 is required for brain keratan sulfate biosynthesis and glial scar formation after brain injury. *Glycobiology*, 16(8), 702–710. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj115>
- Zhang, H., Uchimura, K., & Kadomatsu, K. (2006). Brain keratan sulfate and glial scar formation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1086, 81–90. <https://doi.org/10.1196/annals.1377.014>
- Zhang, N., Qi, M., Gao, X., Zhao, L., Liu, J., Gu, C., Song, W., Steven, C., Sun, L., & Qi, D. (2016). Response of the hepatic transcriptome to a fl a toxin B 1 in ducklings. 111, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.12.022>
- Zierer, J., Pallister, T., Tsai, P. C., Krumsiek, J., Bell, J. T., Lauc, G., Spector, T. D., Menni, C., & Kastenmüller, G. (2016). Exploring the molecular basis of age-related disease comorbidities using a multi-omics graphical model. *Scientific Reports*, 6(October), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep37646>

Material suplementario

Tablas Suplementarias

1. **Tabla suplementaria 1.** Conjunto de reacciones del metabolismo del sulfato de queratán con regulación positiva después del tratamiento con tibolona.

IDENTIFICACIÓN	Subsistema	Reacción de fórmula	Descripción
G14T10g	Síntesis de queratán sulfato	$udpgal[g] + ksi_pre14[g] \rightarrow h[g] + udp[g] + ksi_pre15[g]$	beta-N-acetilglucosaminilglucopéptido beta-1,4-galactosiltransferasa, Golgi
G14T15g	Síntesis de queratán sulfato	$udpgal[g] + ksi_pre29[g] \rightarrow h[g] + udp[g] + ksi_pre30[g]$	beta-N-acetilglucosaminilglucopéptido beta-1,4-galactosiltransferasa, Golgi
G14T16g	Síntesis de queratán sulfato	$udpgal[g] + ksi_pre32[g] \rightarrow h[g] + udp[g] + ksi_pre33[g]$	beta-N-acetilglucosaminilglucopéptido beta-1,4-galactosiltransferasa, Golgi
G14T17g	Síntesis de queratán sulfato	$udpgal[g] + ksi_pre35[g] \rightarrow h[g] + udp[g] + ksi_pre36[g]$	beta-N-acetilglucosaminilglucopéptido beta-1,4-galactosiltransferasa, Golgi
G14T6g	Síntesis de queratán sulfato	$udpgal[g] + ksi_pre2[g] \rightarrow h[g] + udp[g] + ksi_pre3[g]$	beta-N-acetilglucosaminilglucopéptido beta-1,4-galactosiltransferasa, Golgi
G14T7g	Síntesis de queratán sulfato	$udpgal[g] + ksi_pre5[g] \rightarrow h[g] + udp[g] + ksi_pre6[g]$	beta-N-acetilglucosaminilglucopéptido beta-1,4-galactosiltransferasa, Golgi
G14T8g	Síntesis de queratán sulfato	$udpgal[g] + ksi_pre8[g] \rightarrow h[g] + udp[g] + ksi_pre9[g]$	beta-N-acetilglucosaminilglucopéptido beta-1,4-galactosiltransferasa, Golgi
G14T9g	Síntesis de queratán sulfato	$udpgal[g] + ksi_pre11[g] \rightarrow h[g] + udp[g] + ksi_pre12[g]$	beta-N-acetilglucosaminilglucopéptido beta-1,4-galactosiltransferasa, Golgi

Material suplementario

S23T3g	Síntesis de queratán sulfato	cmpacna[g] + l2fn2m2masn[g] -> h[g] + ksi_pre1[g] + cmp[g]	beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa (complejo N-glicano)
S6T13g	Síntesis de queratán sulfato	ksi_pre31[g] + paps[g] -> h[g] + ksi_pre32[g] + pap[g]	galactosa/N-acetilglucosamina 6-O-sulfotransferasa, aparato de Golgi
S6T14g	Síntesis de queratán sulfato	ksi_pre34[g] + paps[g] -> h[g] + ksi_pre35[g] + pap[g]	galactosa/N-acetilglucosamina 6-O-sulfotransferasa, aparato de Golgi
S6T15g	Síntesis de queratán sulfato	ksi_pre36[g] + paps[g] -> h[g] + pap[g] + ksi[g]	galactosa/N-acetilglucosamina 6-O-sulfotransferasa, aparato de Golgi
S6T4g	Síntesis de queratán sulfato	ksi_pre4[g] + paps[g] -> h[g] + ksi_pre5[g] + pap[g]	galactosa/N-acetilglucosamina 6-O-sulfotransferasa, aparato de Golgi
S6T5g	Síntesis de queratán sulfato	ksi_pre7[g] + paps[g] -> h[g] + ksi_pre8[g] + pap[g]	galactosa/N-acetilglucosamina 6-O-sulfotransferasa, aparato de Golgi
S6T6g	Síntesis de queratán sulfato	ksi_pre10[g] + paps[g] -> h[g] + ksi_pre11[g] + pap[g]	galactosa/N-acetilglucosamina 6-O-sulfotransferasa, aparato de Golgi
S6T7g	Síntesis de queratán sulfato	ksi_pre13[g] + paps[g] -> h[g] + ksi_pre14[g] + pap[g]	galactosa/N-acetilglucosamina 6-O-sulfotransferasa, aparato de Golgi
S6T8g	Síntesis de queratán sulfato	ksi_pre16[g] + paps[g] -> h[g] + ksi_pre17[g] + pap[g]	galactosa/N-acetilglucosamina 6-O-sulfotransferasa, aparato de Golgi

1. **Tabla suplementaria 2.** Conjunto de reacciones críticas del modelo PA que tienen un papel crítico y divergente en los modelos sano y de tibolona.

Reacción	PA_modelo	modelo saludable	modelo tibolona	Subsistema
3DSPHR	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los esfingolípidos
ADSL1	Crítico	Crítico	Crítico	Interconversión de nucleótidos
ADSL2	Crítico	Crítico	Crítico	Síntesis de purina
ADSS	Crítico	Crítico	Crítico	Interconversión de nucleótidos
AGPAT1	Crítico	Crítico	Crítico	Síntesis de triacilglicerol
AICART	Crítico	Crítico	Crítico	Síntesis de purina
AIRECr	Crítico	Crítico	Crítico	Síntesis de purina
C3STDH1Pr	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo del colesterol
C3STKR2r	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo del colesterol

C4STMO1r	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo del colesterol
CDIPTr	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los glicerofosfolípidos
CEPTE	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los glicerofosfolípidos
CHOQUE	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los glicerofosfolípidos
CLS_hs	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los glicerofosfolípidos
CO2ter	Crítico	Crítico	Crítico	Transporte reticular endoplásmico
COAtm	Crítico	Intermitente	Crítico	Transporte, mitocondrial
DAGK_hs	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los glicerofosfolípidos
DATPtn	Crítico	Crítico	Crítico	transporte nuclear
DCTPtn	Crítico	Crítico	Intermitente	transporte nuclear
DESAT18_10	Crítico	Crítico	Crítico	Síntesis de ácidos grasos
DGTPtn	Crítico	Intermitente	Intermitente	transporte nuclear
DHCR72r	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo del colesterol
DHCRD1	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los esfingolípidos
DSAT	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los esfingolípidos
ECOA1m	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo del triptófano
EX_Rtotal(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
EX_Rtotal2(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
EX_chol(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
EX_cys_L(e)	Crítico	Intermitente	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
EX_glu_L(e)	Crítico	Intermitente	Intermitente	Reacción de intercambio/demanda
EX_ile_L(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
EX_inost(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
EX_leu_L(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
EX_InInca(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
EX_lys_L(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
EX_met_L(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
EX_fe_L(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
EX_pi(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
EX_pro_L(e)	Crítico	Intermitente	Redundante	Reacción de intercambio/demanda
EX_thr_L(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
EX_trp_L(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda

Material suplementario

EX_tyr_L(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
EX_val_L(e)	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
FACOAL1832	Crítico	Crítico	Crítico	oxidación de ácidos grasos
FACOAL184	Crítico	Crítico	Crítico	oxidación de ácidos grasos
FAOXC180x	Crítico	Crítico	Crítico	oxidación de ácidos grasos
FORt2m	Crítico	Intermitente	Crítico	Transporte, mitocondrial
FORtr	Crítico	Crítico	Crítico	Transporte reticular endoplásmico
FTHFLm	Crítico	Intermitente	Crítico	Metabolismo del folato
GPD	Crítico	Intermitente	Intermitente	Glucólisis/gluconeogénesis
GARFT	Crítico	Crítico	Crítico	Síntesis de purina
GHMT2r	Crítico	Intermitente	Intermitente	Metabolismo de la glicina, serina, alanina y treonina
GLNS	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo del glutamato
GLUPRT	Crítico	Crítico	Crítico	Síntesis de purina
GMT	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de la glicina, serina, alanina y treonina
GPAM_hs	Crítico	Crítico	Crítico	Síntesis de triacilglicerol
H2Otp	Crítico	Intermitente	Intermitente	Transporte peroxisomal
HACD1m	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo del triptófano
HMGCOASim	Crítico	Intermitente	Crítico	Metabolismo del colesterol
HMGCOAtm	Crítico	Intermitente	Crítico	Transporte, mitocondrial
Htr	Crítico	Intermitente	Crítico	Transporte reticular endoplásmico
IMPC	Crítico	Crítico	Crítico	Síntesis de purina
IPDPtx	Crítico	Crítico	Crítico	Transporte peroxisomal
LNLNCat	Crítico	Crítico	Crítico	Transporte, extracelular
LNSTLSr	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo del colesterol
LSTO2r	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo del colesterol
OROTGLUt	Crítico	Intermitente	Redundante	Transporte, extracelular
PETHCT	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los glicerofosfolípidos
PGK	Crítico	Intermitente	Intermitente	Glucólisis/gluconeogénesis
PGPPT	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los glicerofosfolípidos
PGPP_hs	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los glicerofosfolípidos
PRAGSR	Crítico	Crítico	Crítico	Síntesis de purina
PRASCO	Crítico	Crítico	Crítico	Síntesis de purina

PRFGS	Crítico	Crítico	Crítico	Síntesis de purina
PRPPS	Crítico	Crítico	Crítico	Vía pentosa fosfato
RE3273C	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo del fosfato de fosfatidilinositol
RTOTAL2FATPc	Crítico	Crítico	Crítico	Transporte, extracelular
SARCStm	Crítico	Crítico	Crítico	Transporte, mitocondrial
SARDHm	Crítico	Crítico	Crítico	ciclo de la urea
SERPIENTE	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los esfingolípidos
SMS	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los esfingolípidos
SQLEr	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo del colesterol
STCOAtx	Crítico	Crítico	Crítico	Transporte peroxisomal
biomasa_reacción	Crítico	Crítico	Crítico	Reacción de intercambio/demanda
r0276	Crítico	Intermitente	Crítico	Catabolismo de purinas
r0287	Crítico	Crítico	Crítico	oxidación de ácidos grasos
r0480	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los glicerofosfolípidos
r0488	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo del colesterol
r0633	Crítico	Crítico	Crítico	oxidación de ácidos grasos
r0666	Crítico	Crítico	Crítico	Síntesis de purina
r0730	Crítico	Crítico	Crítico	oxidación de ácidos grasos
r0731	Crítico	Crítico	Crítico	oxidación de ácidos grasos
r0732	Crítico	Crítico	Crítico	oxidación de ácidos grasos
r0733	Crítico	Crítico	Crítico	oxidación de ácidos grasos
r0734	Crítico	Crítico	Crítico	oxidación de ácidos grasos
r0735	Crítico	Redundante	Crítico	oxidación de ácidos grasos
r0780	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo del colesterol
r0781	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo del colesterol
r0788	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los esfingolípidos
r0789	Crítico	Crítico	Crítico	Metabolismo de los esfingolípidos
r0791	Crítico	Crítico	Crítico	oxidación de ácidos grasos
r0839	Crítico	Intermitente	Redundante	Transporte, extracelular
r1254	Crítico	Crítico	Crítico	oxidación de ácidos grasos
r1380	Crítico	Crítico	Intermitente	Metabolismo del colesterol
r1381	Crítico	Crítico	Intermitente	Metabolismo del colesterol

Material suplementario

Tabla suplementaria 3

ID UniProt	Nombre	Tipo	ID PDB	Cobertura	Calidad	Código	Nombre	Tipo	ID PDB
P34896	<i>Serine hydroxymethyltransferase</i>	Exp	1BJ4	97%	2,6	PLP	<i>Pyridoxal-5'-P</i>	CC	1BJ4
Q9BY49	<i>Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase</i>	Exp	1YXM	100%	1,9	ADP	<i>Adenine</i>	CC	1YXM
P36959	<i>Guanosine monophosphate reductase</i>	Exp	2BLE	100%	1,9	NAD	<i>Nicotinamide</i>	CC	2BLE
Q9P2T1	<i>Guanosine monophosphate reductase 2</i>	Exp	2C6Q	96%	1,7	NDP	<i>(NADPH) Di</i>	CC	2C6Q
P54868	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase</i>	Exp	2WYA	91%	1,7	HMG	<i>3-hydroxy-3-<i>i</i></i>	CC	2WYA
P00558	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	Exp	2WZB	100%	1,5	3PG	<i>3-phosphoglyc</i>	CC	2WZB
O14556	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Exp	3H9E	83%	1,7	NAD	<i>(NAD) Nicoti</i>	CC	3H9E
P11586	<i>C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic</i>	Mod ^{AF}	-	-	-	NAP	<i>(NADP) Nico</i>	CC	6ECP
P04406	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Exp	6YND	100%	1,5	EXP	<i>3,6,9,12,15,18</i>	CC	6YND
P09110	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal</i>	Exp	2IIK	93%	2,5	ACO	<i>Acetyl coenzy</i>	P	1DM3
Q9BV79	<i>Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase, mitochondria</i>	Exp	1ZSY	90%	1,7	8ID	<i>Nicotinamide</i>	P	4W6Z
O43772	<i>Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein</i>	Mod ^{AF}	-	-	-	CDL	<i>Cardiolipin</i>	P	2C3E
O76062	<i>Delta(14)-sterol reductase TM7SF2</i>	Mod ^{AF}	-	-	-	NDP	<i>(NADPH) Di</i>	P	4QUV
P07205	<i>Phosphoglycerate kinase 2</i>	Mod ^{AF}	-	-	-	ADP	<i>adenosine-5'-<i>i</i></i>	P	4AXX
P23786	<i>Carnitine palmitoyltransferase 2</i>	Mod ^{AF}	-	-	-	152	<i>Carnitine</i>	P	155O
Q08426	<i>Enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase</i>	Mod ^{AF}	-	-	-	HSC	<i>(s)-3-hydroxy</i>	P	5OMO
Q9H2D1	<i>Mitochondrial folate transporter/carrier</i>	Mod ^{AF}	-	-	-	CDL	<i>Cardiolipin</i>	P	2C3E
Q9HC21	<i>Mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier</i>	Mod ^{AF}	-	-	-	CDL	<i>Cardiolipin</i>	P	2C3E
Q9UKG9	<i>Peroxisomal carnitine O-octanoyltransferase</i>	Mod ^{AF}	-	-	-	152	<i>Carnitine</i>	P	155O
Q9Y694	<i>Solute carrier family 22 member 7</i>	Mod ^{AF}	-	-	-	5RH	<i>Cytochalasin</i>	P	5EQI
B4DHV9	<i>cDNA FLJ59258, highly similar to Grave disease carrier protein</i>	Mod SM	-	-	-	CXT	<i>Carboxyatract</i>	P	1OKC
P51659	<i>Peroxisomal multifunctional enzyme type 2</i>	Mod SM	-	-	-	NAD	<i>(NAD) Nicoti</i>	P	1ZBQ
Q15067	<i>Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1</i>	Mod SM	-	-	-	FAD	<i>(FAD) Flavin</i>	P	1W07
Q5JRA6 *	<i>MIA SH3 domain ER export factor 3</i>	Mod SM	-	-	-	-	-	P	-
Q6UB35	<i>Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial</i>	Mod SM	-	-	-	ADP	<i>(ADP) Adeno</i>	P	4IOK

