

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

Redes genéticas y determinación de tipo celular en *Arabidopsis thaliana*

Tesis de maestría que presenta:

Mariana Benítez Keinrad

Directora de tesis:
Dra. Elena Álvarez-Buylla Roces

2007

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Programa en Dinámica no Lineal y Sistemas Complejos

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

Redes genéticas y determinación de tipo
celular en *Arabidopsis thaliana*

Tesis de Maestría elaborada por
Mariana Benítez Keinrad
bajo la dirección de
Dra. Elena Álvarez-Buylla Roces

Universidad Autónoma de la Ciudad de México
Programa en Dinámica no Lineal y Sistemas Complejos

2007

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis profesores y compañeros de la Maestría en Dinámica No Lineal y Sistemas Complejos, de quienes aprendí mucho y cuya compañía he disfrutado enormemente. También agradezco de manera muy especial a mi tutora Elena Álvarez-Buylla, a Carlos Espinosa, Pablo Padilla, Pedro Miramontes y a todos los integrantes del Laboratorio de Genética Molecular, Evolución y Desarrollo de Plantas (Instituto de Ecología, UNAM) por sus valiosas enseñanzas, comentarios y discusiones sobre esta tesis y, sobre todo, por su amistad. Finalmente, muchas gracias a mis padres y hermano, a mis amigos y a Manuel por acompañarme durante la maestría y por todo su apoyo y amor.

Resumen

La determinación de tipo celular es uno de los procesos fundamentales en el desarrollo y morfogénesis de los seres vivos. Dicho proceso depende de la interacción compleja de varios elementos, genéticos y no genéticos, por lo que la teoría y herramientas desarrolladas en el marco de los sistemas complejos son de gran utilidad para abordar ésta y otras cuestiones relativas al desarrollo. Aquí se propone un modelo dinámico de redes para entender algunos aspectos de la determinación del tipo celular en el caso particular de la epidermis de hoja y raíz de *Arabidopsis thaliana*. Este modelo permite reproducir resultados y patrones reportados en la literatura, así como explorar el efecto de algunas mutaciones no observadas *in vivo* y proponer hipótesis relativas a la formación de diferentes patrones espaciales en hoja y raíz. Este modelo también provee una explicación dinámica para la adquisición de distintos tipos celulares, sin necesidad de recurrir a elementos organizadores generales, sino estudiado las propiedades globales de una red de regulación genética. Finalmente, los resultados derivados del modelo sugieren que la red de regulación genética aquí estudiada exhibe aspectos dinámicos similares a los de un sistema típico de activador-inhibidor, lo que podría explicar el origen y mantenimiento de patrones celulares espaciales.

Índice general

1. Introducción	13
1.1. El problema de la morfogénesis	13
1.2. Mecanismos de desarrollo	17
1.3. Desarrollo y redes complejas	20
1.4. Difusión y comunicación celular	23
2. Sistemas epidérmicos en <i>Arabidopsis</i>	29
2.1. Raíz: anatomía y mecanismos de desarrollo.	32
2.1.1. Genes asociados a determinación de tipo celular en raíz. 34	
2.2. Hoja: anatomía y mecanismos de desarrollo.	40
2.2.1. Genes asociados a determinación de tipo celular en hoja 41	
2.3. Algunos modelos propuestos hasta ahora	45
2.4. Parámetros <i>vs.</i> contexto celular	50
3. El modelo	55
3.1. Construcción y simulación de la red.	55
3.2. Resultados	60
4. Discusión	65
A. Tablas y reglas lógicas	69
A. Código fuente	73

Índice de figuras

1.1. Patrones característicos resultantes de dinámicas de reacción-difusión. Las tonalidades de gris representan niveles de concentración de los reactivos.	25
1.2. Diagrama del modelo de activación local e inhibición lateral	26
2.1. Anatomía de raíz	33
2.2. Posición de tricoblastos en raíz	33
2.3. Movimiento del inhibidor entre células vecinas	36
2.4. Red genética para raíz	39
2.5. Tricoma en hoja de <i>Arabidopsis</i>	40
2.6. Red genética para hoja	43
2.7. Modelo de Lee y Schiefelbein, 2002	45
2.8. Modelo de Schellmann, 2002	46
2.9. Modelo de Scheres, 2002	47
2.10. Red de regulación para raíz y hoja	54
3.1. Dinámica de la red	64

Índice de cuadros

3.1. Ejemplo de reglas lógicas	56
3.2. Reglas lógicas para el complejo activador	57
3.3. Simulación de mutaciones	62
3.4. Dinámica de red simplificada	63
A.1. Genes activadores	70
A.2. Genes inhibidores	71
A.3. Interacción de los complejos activador e inhibidor	71
A.4. Efecto del complejo activador	72
A.5. Reglas para red reducida	72

Capítulo 1

Introducción

1.1. El problema de la morfogénesis

Cómo se generan las formas y estructuras en los seres vivos, cómo, a partir de lo homogéneo surgen y se mantienen patrones en los organismos y cómo cambian las formas vivas a lo largo de la historia evolutiva, son algunas de las preguntas que se plantean desde el punto de vista de la morfogénesis. Tales preguntas se han abordado de muy distintas maneras, dependiendo de los paradigmas, necesidades y tecnología de cada época. Esto ha llevado a la proposición de diversas, y no siempre excluyentes, respuestas a algunas de las preguntas fundamentales en el estudio del desarrollo y la morfogénesis.

Durante el siglo XIX gran parte de los trabajos realizados en desarrollo suscribían el enfoque de los llamados morfólogos racionalistas. Esta corriente de pensamiento en biología se desarrolló principalmente en Alemania y entre sus representantes más destacados puede mencionarse a Johann W. Goethe, Georges Cuvier, Geoffroy Saint-Hilaire, William MacLeay y Richard Owen [7, 29]. Los morfólogos racionalistas, apoyados en la tradición anatomista de entonces, intentaban encontrar un orden discernible, racional, en la forma y estructura de los seres vivos. Asimismo, propusieron que la diversidad en las formas de los organismos resulta de variaciones o combinaciones de tipos o planes corporales básicos, variaciones ocasionadas por un pequeño número de principios morfogenéticos.

Ya en el siglo XX, D'Arcy Wentworth Thompson escribió su ahora clásico

libro *On Growth and Form* [29, 44]. En él enfatizó el papel de las restricciones físicas en el origen de las formas vivas y, por tanto, en la evolución biológica. Thompson sugirió que el surgimiento de muchas de las estructuras y patrones observados en los organismos vivos son resultado, más que de procesos selectivos, de condiciones mecánicas y de transformaciones que pueden expresarse matemáticamente. Thompson constituye uno de los antecedentes más importantes en el área de la biología matemática, así como en el estudio de la morfogénesis.

Las mismas similitudes morfológicas que inspiraron a los morfólogos racionalistas a buscar principios que gobernarán la morfogénesis en seres vivos, fueron posteriormente el punto de partida de la noción de ancestría y descendencia, misma que constituiría parte fundamental de la propuesta darwiniana. Una vez que se llevó a cabo la síntesis del evolucionismo darwiniano con la genética clásica, la genética de poblaciones y la biología molecular, la interpretación de las convergencias morfológicas en términos de ancestría y descendencia se volvió predominante y gran parte de las ideas desarrolladas por D'Arcy Thompson y los morfólogos racionalistas se dejaron de lado.

Recientemente, se han desarrollado teoría y métodos relacionados con el estudio de los llamados sistemas complejos, es decir, grupos de entidades que interactúan de manera no lineal y exhiben propiedades dinámicas y estructurales colectivas no definidas para las entidades individuales. El estudio de los sistemas complejos, y en particular, de los sistemas biológicos como sistemas complejos, ha devuelto a la discusión actual algunas de las ideas de los morfólogos racionalistas pre-darwinianos. Una de estas ideas consiste en la concepción del organismo como un todo funcional y estructural en el que las partes están correlacionadas e interactúan afectándose unas a otras. El principio de la correlación de las partes enunciado por G. Cuvier refleja esta forma de concebir a los seres vivos [29]. Otra de las ideas que se ha retomado es aquella de que existen procesos universales o genéricos que pueden explicar, al menos parcialmente¹, el origen de las formas vivas. El enfoque

¹Este enfoque no descarta que la selección natural tenga un papel en la evolución de las formas y los procesos morfogenéticos. Sin embargo, no considera que la selección natural (ni migración, deriva génica o selección sexual) y las contingencias históricas constituyan la única explicación posible para el origen y evolución de las formas.

de los sistemas complejos se extiende con respecto al de los morfólogos del siglo XIX en cuanto a que considera que ciertos principios genéricos pueden también ayudar a entender la evolución temporal de los seres vivos, la organización de sistemas ecológicos e incluso de sistemas sociales. Por otro lado, este enfoque integra teoría y métodos provenientes de distintas áreas y echa mano de numerosos recursos computacionales disponibles desde hace apenas unas décadas.

El estudio de la morfogénesis reconoce dos dimensiones, la del desarrollo y la evolutiva. Durante el desarrollo, las modificaciones en la escala intra e intercelular pueden generar cambios conspicuos en la forma de los organismo y a su vez, de tener tales cambios una base heredable, pueden estar asociados a transiciones evolutivas e incluso a procesos de especiación. En los últimos veinte años se han desarrollado proyectos de investigación que intentan abarcar ambos aspectos, tanto el de desarrollo como el evolutivo.

Quienes se interesan en el desarrollo evolutivo han hecho esfuerzos por comprender la manera en que pueden originarse los grandes cambios morfológicos asociados a diversificación, así como por mapear las variaciones del desarrollo en la filogenia. Estos trabajos pueden agruparse bajo el nombre de *evo-devo*, por las palabras en inglés correspondientes a evolución y desarrollo [1].

Tras un periodo de poca actividad, las investigaciones relacionadas con desarrollo y morfogénesis se reactivaron a principios de la década de los ochenta del siglo pasado, con el descubrimiento de los genes homeóticos². Desde entonces, se ha prestado especial interés al estudio de comparado de los patrones de expresión espacio temporal de genes, principalmente de aquéllos estrechamente relacionados con el desarrollo. Aunado al descubrimiento de los genes homeóticos (ver sección 1.2) y de su amplia distribución en los seres vivos, los trabajos en *evo-devo* se vieron reforzados y alentados por la acep-

²Estos genes están relacionados con la adquisición de identidad de las estructuras y órganos de los seres vivos, así como con la determinación inicial de regiones que constituirán segmentos o secciones distintas entre sí en los organismos adultos. Los genes homeóticos están muy conservados entre los organismos multicelulares y probablemente las alteraciones en su expresión hayan dado lugar inovaciones fenotípicas abruptas.

tación de la sistemática filogenética (i.e. la clasificación de los seres vivos a partir de sus relaciones de ancestría), el creciente número de investigaciones en genética y más recientemente, el desarrollo de la genómica y la proteómica, disciplinas orientadas a tratar de comprender las relaciones y la integración de los complejos sistemas moleculares.

En las últimas décadas, se han propuesto distintos modelos teóricos que admiten e incorporan la complejidad del problema de la morfogénesis y hacen uso de teoría y métodos provenientes no sólo de la biología, sino también de la física, las matemáticas y la computación.

El problema de la morfogénesis ha motivado el trabajo de muchos grupos de investigación, tanto teóricos como experimentales. No obstante, frecuentemente parece que estas dos líneas se desarrollaran de manera independiente. Así, uno de los retos que actualmente enfrenta esta área de estudio consiste precisamente en vincular los trabajos experimentales con la elaboración de modelos teóricos [30].

La formulación de problemas relativos al desarrollo en términos de sistemas dinámicos ha permitido describir algunos mecanismos genéricos que posiblemente intervengan en los procesos morfogenéticos, sin embargo, la crítica que muchos biólogos hacen a este tipo de modelos consiste en que carecen de una base material explícita y que rara vez tratan de integrar o predecir mecanismos moleculares explícitos. Por otra parte, es poco frecuente que los trabajos experimentales estén orientados a tratar de probar hipótesis o predicciones derivadas de modelos teóricos. Es en este sentido que resulta importante integrar las labores y resultados de las dos áreas.

Uno de los principales retos en la modelación de procesos del desarrollo consiste en acoplar aspectos espaciales y temporales de procesos como la comunicación celular (al menos sus modalidades más importantes), el crecimiento, la proliferación, expansión y muerte celulares. La elaboración de este tipo de modelos permite no sólo reproducir patrones y estructuras observadas en la naturaleza, sino también responder preguntas que experimentalmente ha resultado difícil contestar, encontrar inconsistencias en la información empírica, predecir el efecto de mutaciones o alteraciones del contexto celular en la formación de patrones, así como poner a prueba diferentes hipótesis y explorar ampliamente el espacio de parámetros moleculares relevantes. Es

posible, por ejemplo, evaluar la importancia relativa de diferentes procesos, como los distintos tipos de comunicación celular, en los eventos propios del desarrollo.

El presente trabajo aborda un problema particular de la morfogénesis en plantas desde el enfoque de los sistemas complejos. Pretende contribuir al entendimiento de un proceso fundamental en el desarrollo, la determinación del tipo celular, a partir de integrar la evidencia experimental generada por numerosos laboratorios en un modelo de red en que se consideran interacciones no lineales entre los elementos (aquí genes) y que permite reproducir algunos aspectos conocidos de este procesos y simular algunos poco conocidos o explorados. La pregunta principal que este trabajo intenta responder es si el perfil de expresión genética característico de ciertos tipos celulares en plantas resulta de la dinámica colectiva de un grupo de genes que interactúan entre sí y para tratar responderla hace uso de una de las herramientas desarrolladas en el marco de los sistemas complejos, los modelos dinámicos de redes.

1.2. Mecanismos de desarrollo

El desarrollo constituye la transformación de un cigoto en un organismo con estructura y función complejas. A lo largo de este proceso las células se diferencian, es decir, adquieren características que las hacen distintas al resto y que derivan en la formación de los distintos órganos y estructuras del organismo. En plantas, en contraste con lo que ocurre en animales, el desarrollo es indeterminado, es decir, constantemente se forman estructuras nuevas, tales como ramas, hojas y flores.

Durante la morfogénesis, las células y grupos de células se dividen, crecen, mueren, cambian de forma y se diferencian, modifican su medio, intercambian información y se desplazan. Estos procesos son clave en el desarrollo y pueden tener un papel más o menos importante dependiendo del tipo de organismo en que se lleven a cabo. Por ejemplo, en plantas la pared celular impide que las células se desplacen, por lo que la migración no tiene un papel relevante en el desarrollo de plantas, mientras que la comunicación local, es decir, entre células vecinas, es sumamente importante.

El que en plantas los procesos de desarrollo puedan observarse a lo largo de toda su vida y que no presenten migración, simplifica el estudio de muchos aspectos del desarrollo. Aunado a esto, las plantas son sumamente plásticas³ ante cambios en el ambiente por lo que constituyen un objeto de estudio que permite abordar preguntas sobre la manera en que distintos factores ambientales y genéticos participan en el desarrollo.

Se ha propuesto que la identidad de cada célula está dada en gran medida por una combinación de genes activos que corresponde al estado estacionario de una red compleja de regulación genética [10]. Además, los factores ambientales e información proveniente de células vecinas pueden modificar el estado de genes en estas redes. Pese a que la tendencia general consiste en estudiar los genes y las interacciones entre genes relevantes para el desarrollo, se ha reconocido que hay factores ecológicos y ambientales que afectan y en cierto sentido sesgan, los procesos de desarrollo. En algunos casos, factores externos al organismo modifican drásticamente su trayectoria ontogenética. Se sabe, por ejemplo, que algunas plantas acuáticas producen hojas morfológica y funcionalmente distintas bajo y sobre el agua, fenómeno conocido como heterofilia [1]⁴. El estudio de procesos de desarrollo mediante modelos de redes como las propuestas por S. Kauffman [10] permite integrar aspectos genéticos y ambientales en un modelo dinámico y constituyen una herramienta valiosa para la organización y entendimiento de la gran cantidad de información generada en las últimas décadas con muy diversas tecnologías.

Así, el mapeo de genotipo a fenotipo en los seres vivos, que constituye un proceso sumamente complejo y poco entendido, está influenciado, al menos, por el componente genético y epigenético (interacciones entre genes) y factores ambientales o físico-químicos no heredables.

Los llamados genes homeóticos son muy importantes en la determinación de la arquitectura de los organismos, así como en el número y distribución de algunas de sus estructuras [1], por lo que tienen un papel central en el desarrollo de plantas y animales. Poco después de que estos genes fueran

³Con plasticidad se hace referencia a la capacidad de los organismos de adaptar su forma y función ante cambios ambientales.

⁴La heterofilia no siempre está asociada a variaciones ambientales; en algunas plantas se forman distintos tipos de hojas dependiendo de la etapa de desarrollo en que el organismo se encuentre y no de cambios en las condiciones ambientales.

descritos en *Drosophila*, se descubrió que están sumamente conservados en grupos taxonómicos muy diversos. De hecho, frecuentemente no sólo están conservadas las secuencias de DNA, sino también los patrones de expresión y la función. Inicialmente se extendió una idea un tanto simplista que consistía en que los cambios morfológicos asociados a transiciones evolutivas debían haber sido causados por la mutación de un gen de este tipo. No obstante, organismos con formas muy diversas tienen genes homeóticos muy parecidos en secuencia y función, lo que hace pensar que si bien tales genes subyacen una fuente importante de variación morfológica, ésta tiene su origen no sólo en el número o divergencia de los genes, sino también en procesos sutiles y en alteraciones que involucran, además de posibles cambios en secuencia, cambios en la regulación del patrón espacio temporal de expresión de estos genes o en las interacciones de regulación entre ellos.

En plantas, los genes homeóticos MADS están asociados a la regionalización y organización de los individuos en estructuras y órganos distintos, por lo que tienen un papel central en los procesos de desarrollo. Estos genes son funcionalmente muy similares a los genes homeóticos Hox descritos en animales, pese a que no tienen un origen común [27]. De hecho, las convergencias que exhiben el desarrollo en plantas y animales son sorprendentes; muchas de las cascadas de reacciones y procesos de regulación caracterizados en plantas parecen ser equivalentes a los de animales, aún cuando el desarrollo de los organismos multicelulares evolucionó independientemente en ambos linajes. Este hecho sugiere que, como habían apuntado autores como D'Arcy Thompson [44], probablemente existan principios genéricos o restricciones estructurales en la evolución de los mecanismos de desarrollo, mismos que podrían comenzar a identificarse y describirse con el uso de la evidencia experimental disponible y de los modelos teóricos.

Muchos de los mecanismos de desarrollo en plantas, así como gran parte de los genes relevantes en estos procesos, han sido estudiados y descubiertos en el organismo modelo *Arabidopsis thaliana*. Esta planta pertenece a la familia Brassicaceae y presenta varias características que la hacen un modelo muy adecuado para estudios genéticos, de desarrollo y fisiológicos [43]. Por un lado, es una planta pequeña que puede completar su ciclo en aproximadamente seis semanas. Por otro, posee un genoma relativamente pequeño (del orden de 10^8

pares de bases) con bajo contenido de secuencias repetidas y completamente secuenciado, lo que ha facilitado la identificación y clonación de genes.

En las secciones siguientes se presentará el marco conceptual y la metodología de los modelos de redes, así como dos casos en que la determinación del tipo celular, es decir, el compromiso de una célula indiferenciada con un destino celular particular, está asociada a una red transcripcional y a procesos de comunicación entre células vecinas. Se describirá cada sistema, el de epidermis de hoja y el de raíz en *Arabidopsis thaliana* se discutirán algunos de los modelos propuestos hasta ahora y se planteará un modelo de red transcripcional que considera los genes involucrados en ambos sistemas.

1.3. Desarrollo y redes complejas

La actividad de muchos genes depende de la presencia o ausencia de los llamados factores de transcripción que se unen a ciertas regiones del DNA y promueven u obstruyen la transcripción de los genes. A su vez, estos factores de transcripción son el producto de la expresión de otros genes. Esto hace que se establezcan relaciones de regulación e interdependencia entre genes, dando lugar a complejas redes de regulación genética. La regulación vía factores de transcripción es muy común, pero existen numerosos y diversos mecanismos de regulación.

Frecuentemente, las interacciones entre genes se estudian como cascadas jerárquicas y estáticas, no obstante tal enfoque parece ser insuficiente en varios sentidos. Los genes generalmente forman parte de procesos de retroalimentación negativa o positiva que un modelo lineal no puede reproducir. Debido a esto y a la creciente información sobre la genética de organismos como *Drosophila* o *Arabidopsis thaliana*, recientemente se han propuesto modelos de redes dinámicas complejas que recuperan muchos aspectos de la fenomenología del desarrollo y ayudan a entender algunos aspectos de estos procesos.

Actualmente, pueden identificarse diferentes enfoques en el estudio de redes genéticas. Uno de ellos consiste en inferir dichas redes a partir de resultados de experimentos de gran escala como los de microarreglos⁵. Este tipo de

⁵Esta técnica permite obtener perfiles de expresión genética para numerosos genes de un organismo en distintos momentos. A partir de este tipo de datos, que frecuentemente

enfoque ha permitido comenzar a integrar y entender la gran cantidad de datos generados recientemente y brinda una visión panorámica de las relaciones entre genes o grupos de genes. El otro enfoque consiste en estudiar colecciones de pocos genes asociados a cierta función, que pueden entenderse como módulos. Desde este enfoque, se caracterizan redes relativamente pequeñas y compuestas por genes bien estudiados. Una ventaja de este enfoque es que debido a que se basa en datos finos de numerosos experimentos, se enfrenta a menos problemas relacionados con el ruido de la información. Aunado a esto, ya que las redes que se manejan están asociadas a una función y a un sistema bien conocidos, la interpretación de los resultados en términos de desarrollo, fenotipo y evolución es mucho más directa. Finalmente, la idea que subyace el estudio de estos pequeños módulos genéticos es que su caracterización posiblemente lleve a describir principios generalizables a otros sistemas.

Las redes están compuestas por nodos o elementos discretos y por aristas que representan las relaciones entre ellos. En las redes transcripcionales, los nodos representan genes y sus relaciones generalmente están mediadas por factores de transcripción⁶.

Las redes asociadas a desarrollo pueden también incorporar aspectos no genéticos. Por ejemplo, pueden integrar nodos que representen factores ambientales que modifican la expresión de ciertos genes.

Uno de los aspectos más interesantes del estudio de redes complejas consiste en que, a diferencia de muchos de los modelos esquemáticos que frecuentemente se presentan en publicaciones de biología molecular, son dinámicos. Ya que los nodos pueden tener varios estados que representan el nivel de activación de los genes y que estos estados cambian en función de las interacciones entre elementos, las redes presentan diversos comportamientos en el tiempo. Pueden exhibir comportamientos periódicos, caóticos, o bien, pueden presentar un número limitado de estados de equilibrio a los que tiende la

están sujetos a altos niveles de ruido, y haciendo uso de técnicas estadísticas, es posible obtener correlaciones entre la actividad de los genes y proponer redes de regulación.

⁶La regulación genética no sólo está dada por factores de transcripción; se han descrito también numerosos mecanismos de regulación postranscripcional que afectan, por ejemplo, la tasa de degradación de proteínas. No obstante, en este trabajo se supone que, para este caso particular, la regulación transcripcional constituye el factor limitante para la función de un gen.

dinámica ([41] y citas ahí presentadas). En el ámbito de las redes genéticas, se ha propuesto que los atractores fijos corresponden a tipos celulares [11].

En los estados de equilibrio, también llamados atractores de punto fijo, el perfil de activación de los nodos, que representa al perfil de expresión genética, se mantiene constante y la configuración de la red se fija. El que una red alcance uno u otro estado de equilibrio depende de la configuración inicial de la misma, es decir, de los estados iniciales de todos los nodos y de las reglas que gobiernan la dinámica de la red. En este contexto, es posible definir cuencas de atracción, que representan el número de condiciones iniciales que, dada cierta dinámica, llegan a algún estado estacionario.

El estudio de las redes complejas ha modificado de manera importante el tipo de preguntas y respuestas que se plantean en diversas áreas de la biología y ha transformado fundamentalmente el entendimiento de la organización celular. De manera especial, el enfoque de las redes complejas apunta a una ruta que quizá lleve a la integración de la gran cantidad de información sobre genética y procesos moleculares con que actualmente se cuenta.

Si bien la teoría relativa a redes complejas ha provisto de herramientas metodológicas y de un marco teórico importantes para el entendimiento de diversos fenómenos biológicos, aún hay numerosos aspectos que permanecen poco explorados. Algunas de las cuestiones abiertas con respecto a las redes de regulación genética se refieren al origen evolutivo de tales redes, así como a los cambios que éstas han sufrido en el tiempo en distintos taxones y al efecto que tales cambios han podido tener en la evolución de las formas vivas.

Ha habido ya intentos por caracterizar diferentes tipos de redes de regulación genética y las propiedades de cada uno. Por ejemplo, I. Salazar-Ciudad, S.A. Newmann y R.V. Solé [33, 34, 35, 40] describieron dos clases de redes, que por su topología denominaron emergentes y jerárquicas.

Por un lado, las redes emergentes son en cierto sentido más flexibles y permiten explorar un mayor número de patrones globales que las redes jerárquicas, lo que en términos biológicos puede traducirse como un mayor número de fenotipos o morfologías posibles. Por otro lado, las redes jerárquicas parecen ser bastante más robustas ante la variación en los parámetros y condiciones iniciales que las emergentes. Estos autores proponen que en el ámbito evolutivo, posiblemente las redes emergentes aparecieron primero y permitieron

una amplia diversificación morfológica en diversos taxones, pero que tales redes se fueron modificando en redes más robustas, las jerárquicas.

Otros autores han estudiado las propiedades estructurales y dinámicas de redes biológicas; ecológicas, metabólicas y, en particular, de regulación genética [2, 14]. Así, han hallado que muchas de estas redes parecen ser libres de escala, es decir, mantienen propiedades estadísticas y topológicas en distintos niveles de resolución. Se ha observado también que muchas de las redes biológicas son jerárquicas y modulares, lo que significa que existen cúmulos de nodos que ocasionalmente se conectan con otros cúmulos. Finalmente, se han caracterizado patrones predominantes en la geometría de las conexiones y se ha propuesto que la abundancia de cierto patrón permite clasificar a las distintas redes, tanto biológicas como sociales, en grupos estructurales y funcionales [28].

Con el fin de explicar el origen de tales características, investigadores como A. Barabasi [3] han propuesto mecanismos mediante los cuales podrían ensamblarse y evolucionar este tipo de redes. Sin embargo, el significado biológico de estos mecanismos no es claro y quedan aún muchas preguntas referentes a las implicaciones evolutivas de estas propuestas.

Pese a que recientemente se han realizado numerosos trabajos sobre redes complejas en sistemas biológicos, aún es necesario caracterizar estructuras y procesos genéricos en este tipo de redes y explicar su origen en términos biológicos. Como ejemplo, es muy frecuente encontrar asas de retroalimentación en redes de regulación genética y, sin embargo, no se conocen del todo sus consecuencias funcionales ni los procesos evolutivos que han llevado a su origen y mantenimiento. Así, el estudio de la estructura, dinámica y evolución de redes de sistemas particulares (*e.g.* una comunidad ecológica o un módulo pequeño de regulación genética) contribuyen al entendimiento del sistema particular de estudio, pero también a la integración de una teoría general de redes biológicas.

1.4. Difusión y comunicación celular

Como se mencionó anteriormente, la comunicación intra e intercelular afecta los patrones de expresión genética en las células, y, por lo tanto, afecta

la formación de patrones celulares espacio-temporales, constituyendo uno de los mecanismos de desarrollo más relevantes.

Parece claro que la utilización de redes en la modelación de las interacciones entre genes relacionados con el desarrollo es relevante, así como también lo es el estudio de la dinámica y estructura de tales redes. Sin embargo, aún queda abierta la cuestión de cómo acoplar o integrar estas redes en un contexto celular o multinuclear. En este sentido, el entendimiento de los procesos de comunicación intra e intercelular, así como de la modificación de los estados de las redes, es fundamental si se desea explicar el surgimiento de patrones morfológicos macroscópicos.

En 1952 Alan M. Turing publicó un trabajo que sentó la base para muchas investigaciones posteriores relacionadas con biología del desarrollo [45]. Su artículo lleva como nombre *The chemical basis of morphogenesis* y en él propone un mecanismo que, basado en leyes físico-químicas bien conocidas, pretende explicar el origen y mantenimiento de heterogeneidades o patrones en la concentración de morfógenos. Según Turing, estas heterogeneidades podrían subyacer el surgimiento de la estructura anatómica de organismos vivos. Lo que Turing sugirió es que un sistema compuesto por sustancias químicas, llamadas morfógenos, que reaccionan entre sí mientras se difunden, basta para dar cuenta de diversos fenómenos morfogenéticos.

De manera muy general, el sistema que relaciona a las sustancias químicas puede plantearse como un par de ecuaciones diferenciales parciales como las que se muestran a continuación.

$$\frac{\partial a}{\partial t} = \frac{k_1 a^2}{i} - k_2 a + D_a \nabla^2 a \quad (1.1)$$

$$\frac{\partial i}{\partial t} = k_3 a^2 - k_4 i + D_i \nabla^2 i. \quad (1.2)$$

En las ecuaciones 1.1 y 1.2 las tasas de síntesis de activador e inhibidor, $\partial a/\partial t$ y $\partial i/\partial t$ respectivamente, se expresan en términos de su síntesis y degradación, asociadas a k_n , y de su tasa de difusión, D_n .

La parte reactiva de las ecuaciones generalmente se plantea partiendo de la ley de acción de masas, que establece que la tasa de una reacción es proporcional a la concentración de los reactivos. Por su parte, el término asociado a difusión se deriva, en su versión más simple, de la ley de Fick, que

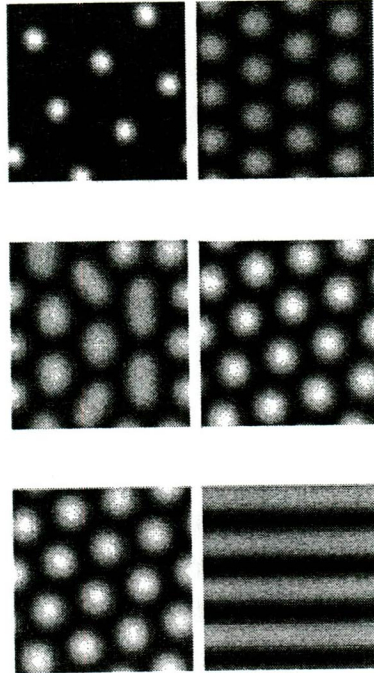


Figura 1.1: Patrones característicos resultantes de dinámicas de reacción-difusión. Las tonalidades de gris representan niveles de concentración de los reactivos.

enuncia que los compuestos se mueven espontáneamente de las regiones de mayor concentración a las de menor.

Una de las ventajas de los modelos de reacción-difusión como los planteados por Turing es que, dado que se enuncian como sistemas de ecuaciones diferenciales parciales, permiten introducir la dimensión espacial en el modelaje de fenómenos morfogénéticos.

Actualmente, se utilizan sistemas de reacción-difusión similares a los que planteó Turing para modelar procesos morfogénéticos en muy diversos seres vivos. En este área destacan los trabajos de Gierer, Meinhardt y Murray, entre otros [23, 22], que, derivados de la propuesta original de Turing, han contribuido a establecer las condiciones necesarias y suficientes para que se

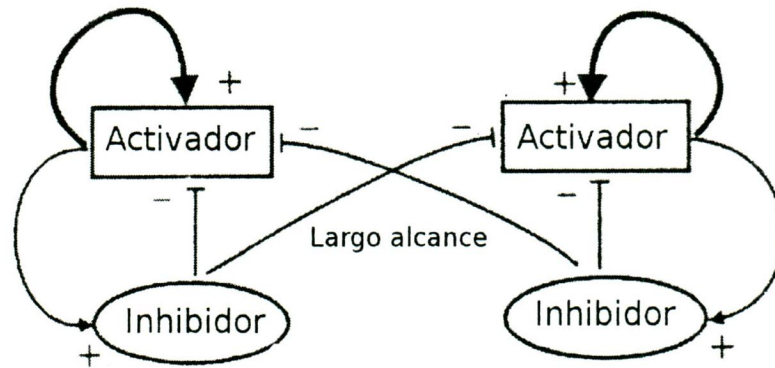


Figura 1.2: Diagrama del modelo de activación local e inhibición lateral propuesto originalmente por Meinhardt y Gierer y caso particular de un sistema reactivo difusivo.

lleve a cabo la formación de patrones complejos en sistemas de reacción-difusión. En el caso particular de los sistemas activador-inhibidor, que es un tipo de sistema reacción-difusión de Turing, las condiciones se enumeran brevemente a continuación. Es necesario que exista un *activador*, es decir, una sustancia que promueva su propia síntesis (retroalimentación positiva) y un *inhibidor* que regule negativamente la síntesis del activador, pero que sea regulado positivamente por el mismo activador. Para que se dé la formación de patrones, el coeficiente de difusión del inhibidor debe ser mayor que el del activador. Esta condición puede considerarse un caso particular de un mecanismo aparentemente ubicuo conocido como activación local e inhibición lateral (figura 1.2) [23, 22]. En general, cualquier sistema que produzca un gradiente o un patrón discontinuo en la distribución de activador e inhibidor requiere de un mecanismo subyacente al desplazamiento de tales sustancias. En este sentido, la difusión, que ocurre espontáneamente y de manera pasiva, ha destacado como el más parsimonioso.

Se han descrito numerosos mecanismos de comunicación celular además

de la difusión [30] (*e.g.*, transporte activo, división no simétrica de una célula, entre otros) por lo que frecuentemente se cuestiona la relevancia de los procesos difusivos durante el desarrollo. En efecto, se ha observado que mecanismos distintos a la difusión pueden ser sumamente importantes, por lo que quizá los modelos de desarrollo debieran integrarlos. No obstante, la difusión parece tener un papel significativo, sobre todo en plantas, cuyas células generalmente presentan abundantes conexiones llamadas plasmodesmata a través de las cuales se difunden muchos tipos de moléculas, incluso algunos factores transcripcionales [12].

Por otro lado, es posible que algunos de los mecanismos de comunicación puedan modelarse mediante sistemas similares a los que se utilizan para modelar procesos difusivos. Por ejemplo, quizá los modelos de difusión en medios anisotrópicos, *i.e.* medios no homogéneos, que determinan cierta direccionalidad, puedan simular la transmisión de ciertas señales.

En este trabajo se pretende entender algunos de los mecanismos que subyacen la diferenciación de células epidérmicas y la formación de patrones espaciales en hoja y raíz de *Arabidopsis thaliana*, así como la evolución de tales mecanismos y su efecto en características fenotípicas.

La primera parte del trabajo consistió en recabar e integrar información proveniente de fuentes experimentales. A partir de estos datos, se identificaron los genes que intervienen en la aparición y distribución de pelos epidérmicos, un tipo celular, y las relaciones que establecen entre ellos.

Dado que los genes involucrados en los procesos de desarrollo que aquí interesan se relacionan unos con otros, la síntesis de la información experimental resulta casi naturalmente en una red de regulación con interacciones no lineales, mismas que se expresan como reglas lógicas.

Con base en estas reglas lógicas se define una red genética cuya dinámica es estudiada mediante simulaciones computacionales. El estudio de la dinámica consiste de manera general en encontrar el número de estados estacionarios o atractores de la red, explorar el espacio de condiciones iniciales y asociar cada atractor con un conjunto de condiciones iniciales o cuenca de atracción.

Finalmente, se proponen modelos de acoplamiento de las redes celulares simulando procesos difusivos. Esto con el fin de responder, al menos parcialmente, preguntas relativas a la formación de patrones espaciales en la

Capítulo 2

Sistemas epidérmicos en *Arabidopsis*

La epidermis constituye la capa celular más externa de un organismo. Los sistemas epidérmicos de hoja y raíz en *Arabidopsis thaliana* han sido ampliamente utilizados como modelos experimentales debido a que permiten estudiar los procesos de subdiferenciación celular con cierta facilidad. Muchos de los fenotipos asociados a mutantes pueden caracterizarse a simple vista y las mutaciones sobre genes relacionados a la sudiferenciación en epidermis no afectan aspectos esenciales para la supervivencia de la planta. Por otra parte, ambos son sistemas sencillos en los que sólo interesa el estudio de dos tipos celulares: el de pelo (tricoma en hoja y tricoblasto en raíz) y el de no pelo. Adicionalmente, los patrones de distribución de pelos son sencillos, por lo que representan un modelo simple para el estudio de mecanismos de comunicación celular, patrones de división y finalmente, de diferenciación. Cabe mencionar, sin embargo, que los patrones de distribución de células diferenciadas varían notablemente en otros grupos de plantas.

La red de regulación genética asociada a la determinación de tipo celular, en particular de pelo o no pelo en epidermis, es un ejemplo de una red pequeña bien caracterizada y relacionada con una función particular en el desarrollo de plantas. Como se dijo antes, el estudio de este tipo de sistemas bien estudiados desde la biología molecular, posiblemente facilite el reconocimiento de principios del desarrollo que puedan ayudar a entender otros

sistemas, tanto en *Arabidopsis thaliana* como en otros organismos. Asimismo, el estudio de las redes genéticas asociadas a este tipo de sistemas, genera resultados que pueden interpretarse en términos de los procesos celulares y de desarrollo del modelo experimental.

Algunos procesos de diferenciación, tanto en plantas como en animales, tienen como base la división celular asimétrica, lo que significa que el destino de las células hijas depende de su linaje, más que de su posición respecto a otras células. Sin embargo, varios trabajos han mostrado que, si bien la diferenciación por linaje es relevante en procesos como la formación de estomas, no lo es en la diferenciación de tricomas y tricoblastos en *Arabidopsis thaliana* [17].

La distribución espacial de las células diferenciadas en epidermis de raíz y hoja de *Arabidopsis thaliana* es distinta en cada caso: la raíz exhibe pelos alineados en bandas, mientras que los de hoja se distribuyen homogéneamente en la superficie.

Larkin y colaboradores [17] cuantificaron la distancia promedio entre los pelos en epidermis de hoja y observaron que éstos mantienen entre sí una distancia mínima, es decir, están más separados entre sí de lo que se esperaría por azar, lo que frecuentemente se denota como patrón espaciado. Debido a que hay crecimiento y proliferación posteriores a la subdiversión epidérmica, la distribución de los tricomas maduros no necesariamente corresponde a aquélla de los tricomas en desarrollo. Por ello, estos autores cuantificaron también las distancias entre tricomas en desarrollo, encontrando el mismo tipo de distribución¹.

Los mecanismos de desarrollo que dan lugar a la distribución y número de pelos en raíz y hoja también presentan diferencias importantes. Por un

¹En el trabajo citado [17], se cuantificó la relación entre la distancia promedio un tricoma con su vecino más próximo y la distancia promedio esperada en una distribución aleatoria, R . Una distribución completamente aleatoria tiene entonces una $R = 1$, mientras que una distribución hexagonal totalmente ordenada presenta $R = 2,15$. El ecotipo Col de *Arabidopsis thaliana* tiene $R = 1,4$, lo que corresponde a una distribución de distancia mínima similar a la encontrada en estomas de dicotiledóneas y en pelos de la epidermis de insectos. Se estimó la R de un patrón de picos de concentración generado por un sistema activador inhibidor y, para condiciones iniciales aleatorias y fronteras de flujo cero, se obtuvo una R de aproximadamente 1,3.

lado, la posición de los pelos en raíz parece estar determinada por la posición de las células epidérmicas respecto a las corticales, mientras que la aparición de los tricomas en hoja es independiente de la posición relativa de las células y se determina *de novo* cada vez.

Pese a las diferencias en los patrones espaciales de distribución de pelos en hoja y en raíz, numerosos trabajos (ver referencias en [20]) sugieren que probablemente un mismo mecanismo de desarrollo fundamental sea responsable de la asignación de los tipos celulares en epidermis y hoja. Esta idea tiene su base en que muchos de los genes que intervienen en la diferenciación celular en ambos tipos de epidermis tienen secuencias muy similares. De hecho, muchos de estos genes son los mismos, o bien, codifican para moléculas de la misma familia multigénica. Más aún, pese a algunas diferencias sutiles, parece ser que las relaciones de regulación que mantienen estos genes en hoja y en raíz son equivalentes.

Recientemente, varios autores [32, 38] han planteado que en ambos casos quizá se tenga un sistema de inhibición lateral, esto es, un sistema en que la acción de un gen activador, o grupo de genes activadores, *compite* con la de un gen inhibidor que a su vez tiene un efecto sobre la expresión de los genes activadores en células vecinas.

En los últimos años, la idea de que los mecanismos subyacentes a la aparición de pelos en hoja y raíz pueden entenderse como variaciones de un mismo sistema fundamental ha sido difundida y aceptada por diversos grupos de trabajo. No obstante, el cómo dos redes genéticas tan similares en estructura y función dan lugar a patrones espaciales distintos en hoja (uniforme) y en raíz (bandeado), es aún una pregunta abierta.

Ante esta cuestión se han planteado dos hipótesis principales; la que argumenta que los dos patrones se generan a partir de redes muy similares pero con parámetros diferentes (*e.g.*, tasa de producción o degradación de las proteínas codificadas por los genes de la red) y la que sostiene que son las diferencias en el contexto celular² las que causan la formación de patrones distintos. Ambas posturas se explican con mayor detalle en la sección 2.4.

²Con contexto celular se hace referencia a información posicional que afecta los procesos de desarrollo, por ejemplo, diferencias en condiciones iniciales y ambientales, geometría del dominio celular o arreglo y comunicación entre células.

En las secciones siguientes se describirán someramente los mecanismos de desarrollo en la epidermis de hoja y raíz en *Arabidopsis thaliana* y se ahondará en algunas de las propuestas que buscan explicar la diferenciación y la formación de patrones espaciales en estos sistemas.

2.1. Raíz: anatomía y mecanismos de desarrollo.

Por más de un siglo, la epidermis de raíz ha sido un modelo muy útil, dada su relativa sencillez, para explorar los mecanismos genéticos y celulares que subyacen la formación de patrones en la distribución de células diferenciadas [19]. La epidermis constituye un modelo accesible, ya que las células epidérmicas están organizadas en filas y se diferencian siguiendo un gradiente que va de la punta de la raíz a la base de la planta. Aunado a esto, el meristemo de raíz de *Arabidopsis thaliana* tiene una estructura celular regular y es casi transparente, lo que lo hace un sistema simple que facilita el estudio de procesos de comunicación, diferenciación y señalización en plantas.

La raíz madura de *Arabidopsis thaliana* consta de capas concéntricas de células. De la más externa a la más interna, éstas capas son: epidermis, córtex, endodermis y periciclo, hallándose al centro los tejidos vasculares (figura 2.1).

La epidermis de la raíz está conformada por columnas alternadas de células con pelos (H) o tricoblastos y células sin pelos (N) o atricoblastos. Los pelos radiculares son extensiones tubulares de las células epidérmicas. Éstos tienen un papel importante en la absorción de agua y minerales del suelo [20], lo que sugiere que la fijación de estas estructuras a lo largo de la evolución, aunque no necesariamente su aparición *de novo*, pudo haberse debido, al menos parcialmente, a presiones selectivas.

La identidad de las células H o N está determinada por la posición relativa de cada célula con respecto a las células de la capa adyacente, el córtex. Si la célula epidérmica se localiza sobre una pared anticlinal de las células del córtex (ACCW), o sea, la unión de dos células del córtex, ésta dará lugar a una célula con pelo. Si la célula sólo tiene contacto con la pared de solamente una célula del córtex, la célula se diferencia en una célula N (véase figura 2.2).

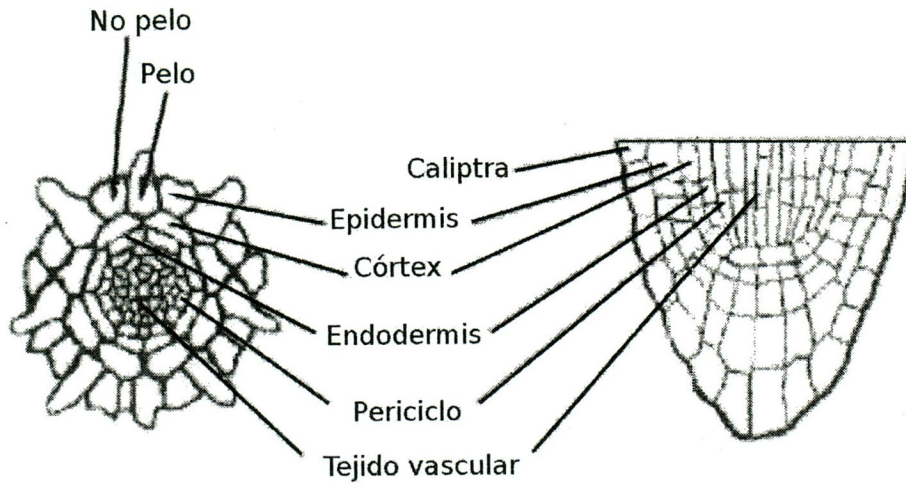


Figura 2.1: Cortes transversal y longitudinal de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

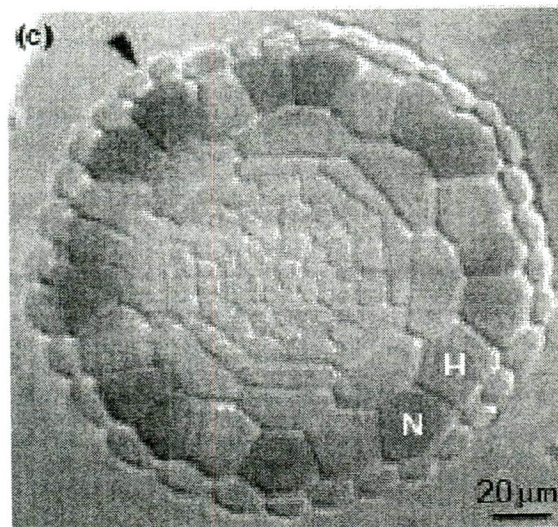


Figura 2.2: Anatomía de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Se ve que las células H se localizan sobre la unión de dos células del córtex.

La localización de los pelos de raíz sobre la ACCW sugiere que la comunicación célula-célula y la información posicional son relevantes en el origen de los patrones bandeados que exhiben los pelos en la epidermis de raíz. La relación entre la posición de las células H con respecto a la ACCW se confirmó con experimentos en que se observó que una fila de células “hijas” de células H se diferenciaban como células N al perder el contacto con la región de la ACCW [4].

Además de la presencia o ausencia de pelos, las células N y H presentan características evidentes desde etapas tempranas del desarrollo que las hacen distintas entre sí. Estos dos tipos celulares difieren en densidad de citoplasma, grado de vacuolación, tamaño, propiedades de la superficie celular y tasa de división [19]. En el tipo silvestre, la proporción de células H y N es aproximadamente 2:3.

2.1.1. Genes asociados a determinación de tipo celular en raíz.

En años recientes se han identificado muchos de los genes relevantes en la diferenciación y organización espacial de pelos epidérmicos. Asimismo, a partir de resultados experimentales diversos³ se han identificado algunas de las relaciones que tales genes mantienen entre sí y se ha descrito, por ejemplo, el efecto que su mutación tiene sobre la expresión de otros genes y sobre el fenotipo.

A continuación se presentan los genes que hasta ahora se han identificado como relevantes en el sistema de epidermis de raíz en *Arabidopsis thaliana*⁴.

³Los resultados experimentales en que se fundamentan las relaciones propuestas para la red genética presentada en este trabajo consisten en fenotipos de mutantes de pérdida de función y de sobreexpresión, patrones de expresión, experimentos de epigénesis y doble híbrido de levadura.

⁴En literatura de biología molecular, la manera convencional de denotar algunas entidades moleculares es la siguiente: los nombres de genes, tanto completos como abreviados, se escriben con mayúsculas y cursivas; los de las proteínas únicamente en mayúsculas y los de líneas mutantes en minúsculas y cursivas.

CAPRICE (CPC) Codifica para una proteína pequeña (aproximadamente 94 aminoácidos) del tipo Myb, que, a diferencia de otras proteínas de esta familia, carece de un dominio que actúa como regulador de transcripción. En raíz, se expresa principalmente en atricoblastos.

Su mutación produce raíces con pocos pelos y su sobreexpresión produce más tricoblastos que el tipo silvestre y menos tricomas en hoja [46].

Regula negativamente a *WER* y a *GL2*, aunque parece que no actúa directamente sobre *GL2*, sino que compete con *WER* en la formación de un complejo proteico, inhibiendo así la actividad de *GL2* [46]. Este gen, que es parcialmente redundante con *TRY* (integrante de la misma familia multigénica), es importante en procesos de inhibición lateral célula-célula, ya que se mueve de una a otra a través de plasmodesmos [36, 46] (figura 2.3).

La distribución longitudinal de *CPC* desde la punta de la raíz hacia la base de la planta va de mayor a menor concentración conforme las células se van diferenciando.

Wada y colaboradores [46] demostraron experimentalmente que la proteína *CPC* es sintetizada principalmente en las células NH y que posteriormente dicha proteína se mueve hacia las células H, en que reprime la transcripción de *GL2*, permitiendo la formación de pelos radiculares. Por ello, se ha dicho que *CPC* actúa como inhibidor lateral en el sistema H/NH de epidermis de raíz (figura 2.3). Los resultados de Wada y colaboradores y el reducido tamaño de la proteína *CPC* permiten suponer que ésta puede difundirse de una célula a otra a través de los plasmodesmos.

GLABRA2 (GL2) Codifica para un homeodominio que muy probablemente actúe como factor de transcripción de genes involucrados en la adquisición del tipo N-NH o T-NT, éste último en hoja, por lo que su expresión afecta directamente la formación de pelos. No obstante, el efecto de su actividad es distinto en hoja y en raíz; en la primera inhibe la formación de pelos, mientras que en hoja, la favorece. *GL2* se expresa principalmente en la zona de elongación en raíz. Los genes que regulan positivamente a *GL2* se conocen como activadores y pese a que son distintos en cada tipo de epidermis, la identidad química de los activadores en hoja y raíz es la misma; corresponden a proteínas del tipo MYB, bHLH y WD40.

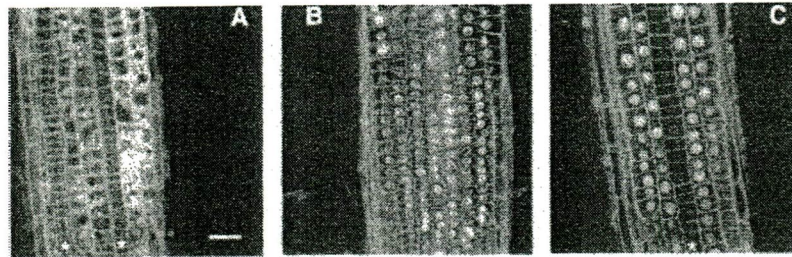


Figura 2.3: Imágenes de los experimentos de Wada y colaboradores [46]. Gracias a las construcción con la proteína verde fluorescente, GFP, puede verse que el gen *CPC* se expresa en algunos núcleos celulares (C), mientras que la proteína CPC se encuentra presente en todas las células en toda la célula (B), sugiriendo fuertemente su movimiento intercelular.

En el tipo silvestre se observó que durante el periodo en que se lleva a cabo la subdiferenciación en epidermis de raíz, *GL2* se expresa principalmente en células que se diferenciarán en células NH [21]. Asimismo, la mutación de *GL2* produce raíces con mucho más tricoblastos que en tipo silvestre, lo que confirma que este gen promueve directamente la formación de células NH [21].

GLABRA 3 (*GL3*) En muchos trabajos se ha experimentado con el gen *R* del maíz y ahora se sabe que *GL3* es su equivalente funcional en *Arabidopsis thaliana* [6]. Los genes *GL3* y *R* codifican para una proteína del tipo bHLH (*helix-loop-helix*) y, dentro de la misma subfamilia, las proteínas *GL3* y ENHANCER OF *GL3* (*EGL3*) son las que tienen más similitud con la proteína *R* de maíz, por lo que *GL3* y *R* se consideran homólogos [31]. Este gen participa en la activación de *GL2* y es capaz, al sobreexpresarse⁵, de recuperar la pérdida de función de otro gen activador de *GL2*, *TRANSPARENT TESTA GLABRA* [6]. Participa también en la regulación positiva de *CPC* y es parcialmente redundante con *EGL3*. Se ha encontrado que su proteína intercatúa con *CPC* y *GLABRA1* (*GL1*). En raíz, los mutantes de *GL3* son deficientes en la especificación del tipo NH y este fenotipo es acentuado si

⁵Con sobreexpresión se entiende la expresión constitutiva, en todo momento y en todo lugar.

se muta también *EGL3*. Asimismo, la sobreexpresión de cualquiera de ellos produce células NH ectópicas en este órgano. Estos resultados sugieren una redundancia parcial entre *GL3* y *EGL3*, que además, tienen una similitud en la secuencia de aminoácidos de 74% entre sí [6].

TRANSPARENT TESTA GLABRA (TTG) Codifica para una proteína del tipo WD40. Su pérdida de función ocasiona formación de pelos en toda la epidermis. Al igual que los genes *GL1*, *WER* y *GL3*, es uno de los activadores de *GL2* y de *CPC*, aunque quizá no lo haga de manera directa [16]. En raíz es expresado principalmente en atricoblastos [5]. Además de participar en la formación de tricomas, este gen afecta también procesos tan diversos como la producción de antocianina y la formación del mucílago⁶ en semilla [47], por lo que se cree que puede ser un gen integrador de varios módulos o subredes genéticas. Su mutante de pérdida de función se caracteriza por presentar mucho más tricoblastos que el tipo silvestre y este fenotipo puede ser recuperado mediante la sobreexpresión de *GL3* y *EGL3*.

WERWOLF (WER) Codifica para un dominio Myb, muy similar al de *GL1*, que es un gen funcionalmente equivalente a *WER*, pero que se expresa principalmente en hoja. Se dice que *WER* y *GL1* son ortólogos con funciones equivalentes en hoja y raíz respectivamente, ya que ambos forman parte de los activadores de *GL2*. Además, se han realizado experimentos en que se intercambian las secuencias que determinan dónde y cuándo se expresan los genes, los promotores, de *WER* y de *GL1* en hoja y raíz y se obtienen patrones iguales a los del tipo silvestre en ambos órganos.

Se expresa principalmente en células destinadas a adoptar el tipo NH [19] y su mutación está caracterizada por un fenotipo de raíces “peludas”, es decir, deficiente en la especificación del tipo NH. En doble híbrido de levadura interactúa con proteínas del tipo bHLH, como las codificadas por *TTG*. *WER*,

⁶Las antocianinas son flavonoides que están asociados, entre otras cosas, a coloración, a protección ante radiación UV y a defensa ante microorganismos. Por otra parte, el mucílago es una capa pegajosa que recubre a la semilla al momento de la germinación. Es notable el hecho de que *TTG* forme parte de procesos muy diversos que, sin embargo, están relacionados con defensa ante herbivoría y ataques de microorganismos.

que actúa como activador de *GL2* en raíz, presenta 57.1% de similitud en la secuencia de con *GL1* [19].

ENHANCER OF *GL3* (*EGL3*) *EGL3* es parcialmente redundante con *GL3* y junto con él puede recuperar la pérdida de función de *TTG*. Con el término *enhancer* se hace referencia al hecho de que este gen potencia el efecto de *GL3*. *EGL3* codifica para una proteína del tipo bHLH y es homólogo, al igual que *GL3*, del gen *R* de maíz [31]. Este gen participa en la activación de *GL2* y *CPC*. Los mutantes de *EGL3* son deficientes en la especificación del tipo NH, pero esta deficiencia se observa claramente sólo cuando la mutación de *EGL3* está acompañada por la de *GL3* [6].

ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE (*ETC1*) Es un gen de la familia Myb, muy similar a *CPC* y *TRY* [13]. El mutante simple de pérdida de función de *ETC1* no tiene efectos significativos, pero el triple mutante *etc try cpc* enfatiza el fenotipo de los mutantes de pérdida de función de *CPC* y *TRY*.

Recientemente se han caracterizado otros genes que parecen afectar el proceso de diferenciación de pelos en raíz, tales como *COTYLEDON1* (*COT1*). Sin embargo, los genes presentados anteriormente parecen ser los más relevantes en este proceso, además de que constituyen un "módulo" en la red de regulación genética que tiene equivalente en el sistema epidérmico de hoja y que está relacionado directamente con la determinación de pelo y no pelo en epidermis. Por ello, el presente trabajo se enfoca en la caracterización de la red conformada por *CPC*, *TRY*, *ETC1*, *GL2*, *GL3*, *EGL3*, *WER* y *TTG* (la expresión de *GL2*, y por lo tanto, de genes regulados por *GL2* que participan en la adquisición del tipo celular determinado puede predecirse a partir de los patrones de expresión de el resto de los genes).

A partir de los experimentos de epistasis⁷ y de los resultados de experimentos de doble híbrido de levadura en que se prueba la interacción de proteínas, se ha propuesto que *WER*, *TTG*, *GL3* y *EGL3* conforman un complejo de regulación transcripcional que promueve la expresión de *GL2*

⁷Estos experimentos están orientados a evaluar si el efecto de mutaciones en un par de genes es aditivo

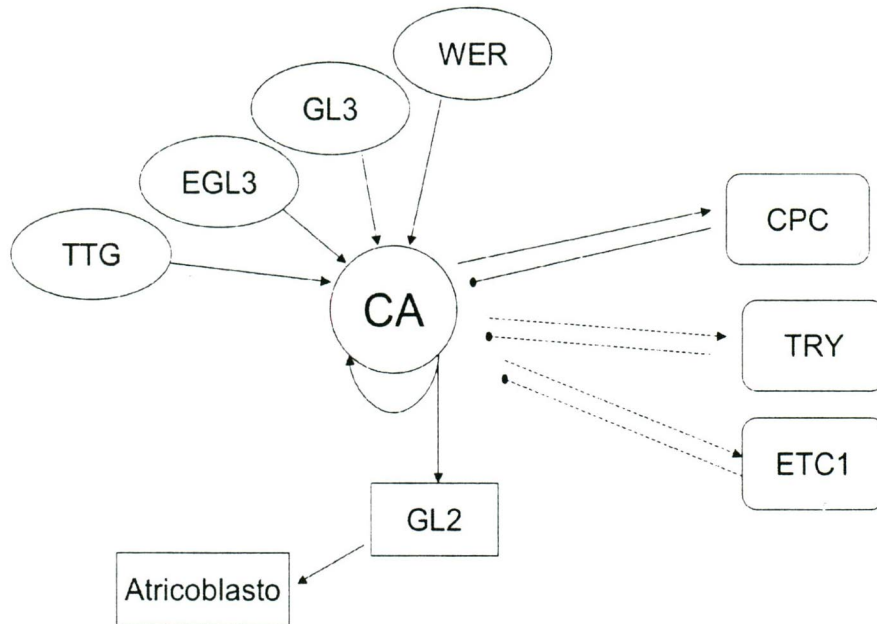


Figura 2.4: Red de transcripción propuesta para la determinación del destino celular en epidermis de raíz en *Arabidopsis thaliana*. Las líneas que terminan en flecha indican regulación positiva, mientras que las otras líneas representan regulación negativa.

en epidermis de raíz, siendo este complejo contrarrestado principalmente por CPC, pero también de manera parcialmente redundante por ETC1 y TRY. Éste último tiene un papel central en el sistema de hoja [36].

Las relaciones de regulación entre los principales genes presentados en esta sección se resumen en la figura 2.4.

Además de los genes presentados, se ha visto que las proteínas asociadas a la ruta de señalización de etileno, tales como *ETHYLENE RESISTANT 1* (*ETR1*) y *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE* (*CTR1*), tienen efectos relevantes en la diferenciación de células H y NH. Al parecer, esta ruta actúa de manera paralela a *WER*, el resto de los genes activadores y *CPC* sobre

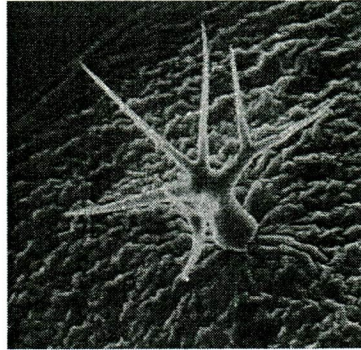


Figura 2.5: Tricoma en hoja de *Arabidopsis thaliana*.

genes como GL2 (ver referencias en [25]).

La ruta del etileno tiene un papel importante en la aparición y desarrollo de pelos en raíz y se tienen numerosos resultados de análisis farmacológicos y de mutantes de esta vía. Por ello, uno de los retos que presenta la modelación de los procesos de aparición y distribución de pelos es precisamente el integrar los mecanismos de señalización, como la vía del etileno, con los procesos de regulación genética en el ámbito celular.

2.2. Hoja: anatomía y mecanismos de desarrollo.

En la epidermis de hoja se distinguen dos tipos de células altamente diferenciadas: los tricomas, que dan lugar a pelos, y las células “guarda”, que forman los estomas. Estos dos tipos de células están separadas por las llamadas células de cementación.

Los tricomas se encuentran en las superficies de órganos aéreos de casi todas las plantas terrestres y presentan una gran diversidad de formas respecto a tamaño, grado de ramificación, etapa de aparición, etcétera [15](figura 2.5).

El patrón que exhiben los tricomas es distinto al de los tricoblastos de raíz. Se ha demostrado que las células T o tricomas se distribuyen de manera

uniforme sobre la superficie de la hoja, dejando una distancia aproximadamente igual entre ellos [17]. Se cree que los tricomas de hojas y tallo son importantes para la defensa ante herbivoría [20] y para el mantenimiento de condiciones locales de humedad y temperatura.

La posición de los tricomas en hoja no parece mostrar ningún sesgo respecto a células de la misma o de capas celulares subyacentes. Aquí, el patrón espacial está determinado principalmente por la posición del primer tricoma, que generalmente aparece en la punta del primordio de hoja, y conforme la superficie de la hoja crece, aparecen tricomas que se van intercalando entre otros [20].

Es posible que los pelos tanto de hoja como de raíz se hayan fijado debido en parte a presiones selectivas, sin embargo éstas no son claras. Asimismo, no se sabe si características como la longitud, morfología y distribución de estas estructuras en la epidermis podrían suponer ventajas adaptativas para los organismos. Si bien se ha reportado que los tricomas tienen un papel importante en defensa ante herbivoría, es posible que los arreglos homogéneo y bandeado que exhiben la hoja y la raíz, respectivamente, permitan un mejor procesamiento de agua en cada caso.

2.2.1. Genes asociados a determinación de tipo celular en hoja

GLABRA1 (GL1) Codifica para un dominio del tipo Myb y, al igual que *WER* en raíz, participa en la regulación positiva de *GL2*. Su mutación de pérdida de función evita la formación de casi todos los tricomas [16]. Su actividad es fundamentalmente local y en epidermis de raíz parece no ser relevante. La expresión constitutiva de este gen no recupera la pérdida de función de *TTG*, ni viceversa, lo que sugiere que actúan conjuntamente, posiblemente al mismo nivel [16].

GLABRA2 (GL2) Codifica para un homeodominio que probablemente actúa como factor de transcripción de genes involucrados en la adquisición de la identidad N-NH o T-NT. Durante la etapa de subdiferenciación, *GL2* se expresa en mayor medida en células que darán lugar a tricomas. Contrario a lo

que sucede en raíz, la mutación de *GL2* produce hojas “calvas”, lo que indica que en epidermis de hoja este gen promueve la formación de tricomas [42].

Los genes que regulan positivamente a *GL2* se conocen como activadores y pese a que uno de ellos es diferente en cada tipo de epidermis, la identidad química de los activadores en hoja y raíz es la misma; corresponden a proteínas del tipo MYB, bHLH y WD40. En hoja son *GL1*, *TTG*, *GL3* y *EGL3*.

GLABRA3 (GL3) Codifica para una proteína bHLH y es redundante con *EGL3*. Interactúa con *GL1* y *TTG* en experimentos de doble híbrido de levadura. Al igual que *GL1*, *EGL3* y *TTG*, participa en la regulación positiva de *GL2* y, por lo tanto, en la formación de tricomas [31]. Su mutante de pérdida de función presenta menos pelos en hoja que el tipo silvestre.

ENHANCER OF GL3 (EGL3) *EGL3* es redundante con *GL3* y junto con él puede recuperar la pérdida de función de *TTG*. Codifica para una proteína del tipo bHLH y es homólogo, al igual que *GL3*, del gen *R* de maíz [31]. Este gen participa en la activación de *GL2*.

TRANSPARENT TESTA GLABRA (TTG) Codifica para una proteína WD40 involucrada en la formación de pelos. Su mutación nula disminuye notablemente formación de pelos en toda la epidermis [16]. Tiene un papel importante en la activación de *GL2*. También está involucrado en la tasa y orientación de la división celular. Recientemente se ha propuesto que *GL1* y *TTG* probablemente establecen un asa de retroalimentación positiva [39].

TRIPTYCHON (TRY) Es un gen de la familia Myb y se expresa principalmente en primordios de hoja y en tricomas en desarrollo. Su expresión en raíz es débil [9]. En hoja es el principal inhibidor de *GL2*, aunque es parcialmente redundante con *CPC* tanto en hoja como en raíz. Posiblemente también participe en procesos de inhibición lateral, pues su mutación ocasiona cúmulos de pelos [36, 37]. Regula negativamente actividad de *GL1*, por lo que indirectamente inhibe a *GL2*.

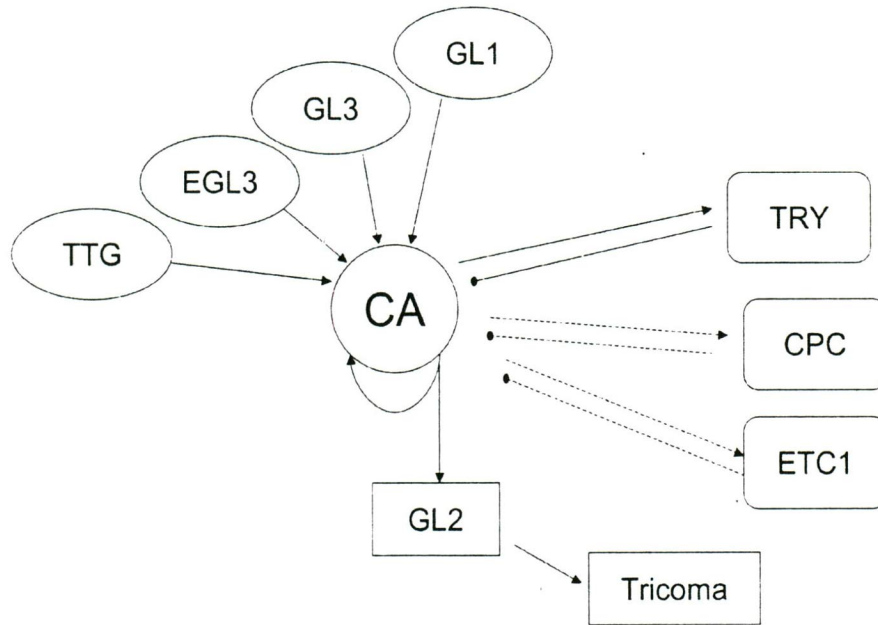


Figura 2.6: Red de transcripción propuesta para la determinación del destino celular en epidermis de hoja en *Arabidopsis thaliana*. Las líneas que terminan en flecha indican regulación positiva, mientras que las otras líneas representan regulación negativa.

ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE (ETC1) Es un gen de la familia Myb, muy similar a la de *CPC* y *TRY* [13]. Los fenotipos de mutantes simples y múltiples indican que es parcialmente redundante con *TRY* y *CPC*, pero su mutante sólo exhibe un fenotipo distinto al silvestre cuando también están mutados *TRY* o *CPC*.

En contraste con lo que sucede en raíz, la expresión de *GL2* está asociada a la formación de células sin pelos en la epidermis de hoja. Sin embargo, se ha identificado un gen que, al igual que *CPC*, tiene un papel importante en el proceso de inhibición lateral, *TRYPTICHON (TRY)* [37]. Pese a que no se ha demostrado que la proteína *TRY* se mueve de una célula a las células vecinas,

se tiene evidencia de que tanto *TRY* como *CPC* actúa de manera similar inhibiendo la expresión de *GL2*, y por lo tanto la formación de tricomas, en células vecinas. Debido a que *GL3*, *GL1* y *TTG* interactúan físicamente en los experimentos de doble híbrido en levadura, se ha propuesto que estos tres elementos constituyen un complejo multimérico que promueve la formación de tricomas y cuya actividad es contrarrestada principalmente por *TRY* [36].

La figura 2.6 resume las relaciones entre los principales genes presentados en esta sección.

Las redes presentadas en esta sección resumen las interacciones entre genes que, basadas en la información empírica hasta ahora disponible, son responsables de la decisión pelo o no pelo en los tejidos epidérmicos de hoja y raíz en *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, aunque cada uno de los genes aquí presentados ha sido estudiado a detalle por uno o varios laboratorios, hay interacciones que se desconocen y algunos resultados experimentales que parecen poco intuitivos o inconsistentes. Por ejemplo, los patrones de expresión, es decir los registros de dónde y cuándo se expresa un gen, muestran que los activadores e inhibidores de *GL2* tienen sus picos de expresión en las mismas células al mismo tiempo. Así mismo, no se sabe cómo se generan y se mantienen durante la etapa de diferenciación celular las heterogeneidades en concentración de las proteínas responsables de la determinación del destino celular.

Por otra parte, aunque se ha encontrado una clara correlación entre los tricoblastos de raíz y su posición respecto al córtex y se sabe que la información posicional depende de una proteína llamada *SCRAMBLED* (*SCM*), no se tiene claro cómo *SCM* afecta la red que conforman los genes presentados arriba. En principio, esta señal podría regular, ya sea positiva o negativamente, tanto a los activadores como a los inhibidores.

En la siguiente sección se presentan algunos de los modelos fundamentalmente esquemáticos que se han propuesto hasta ahora para tratar de entender el proceso de determinación de tipo celular y formación de patrones en epidermis. También se tratará una propuesta teórica elaborada por Pesch y Hulskamp que pretende explicar la aparición de dichos patrones a partir de un sistema dinámico consistente con los datos experimentales [32].

Posteriormente se presentará el modelo de red genética que aquí se pro-

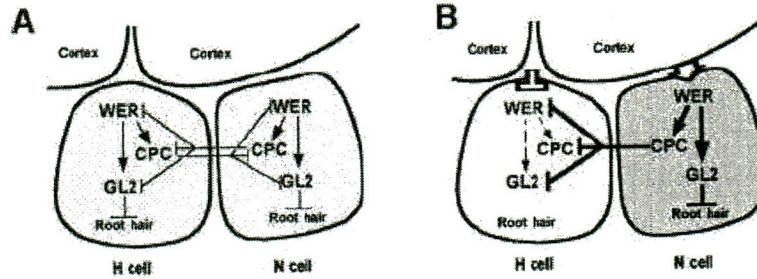


Figura 2.7: Modelo que representa las interacciones reguladoras entre WER, CPC y GL2. Las líneas gruesas indican una elevada expresión del gen al cual apunta. A la izquierda, un sistema que no exhibe sesgo posicional y a la derecha, un sistema en que una señal proveniente del córtex inhibe a WER en la zona ACCW. Tomado de [18].

pone como herramienta para integrar la información experimental dispersa, esclarecer fenotipos poco intuitivos, proponer experimentos nuevos y probar propuestas teóricas como la de Pesch y Hulskamp.

2.3. Algunos modelos propuestos hasta ahora

Con base en los resultados experimentales recabados en los últimos años, se han planteado modelos de regulación subyacentes a la formación de patrones epidérmicos, muchos de los cuales involucran redes de regulación genética y mecanismos de comunicación intercelular, sin embargo no son modelos dinámicos. En esta sección se presentan brevemente algunos ejemplos de dichos modelos.

La figura 2.7 corresponde al modelo de Lee y Schienfelbein para diferenciación celular en epidermis de raíz [18, 19]. Los autores detallan algunas de las relaciones entre genes y distinguen entre un sistema en que la información posicional de un sistema es relevante de uno en que no lo es. Afirman que todas las células epidérmicas expresan a los genes activadores de *GL2* y que CPC puede salir de una célula e impedir la expresión de genes activadores

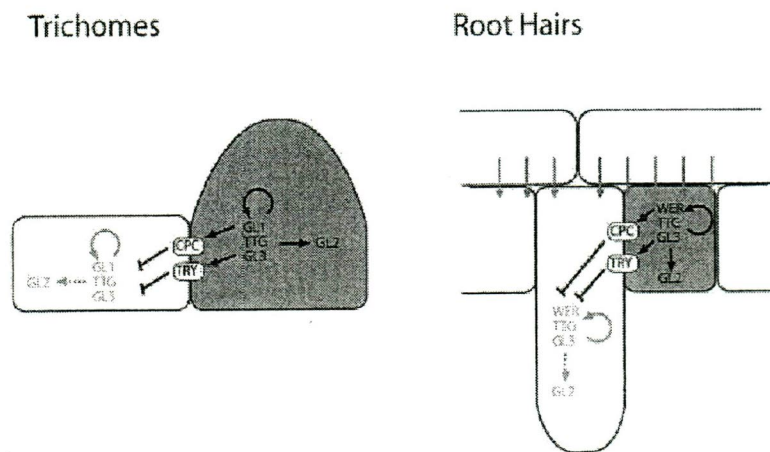


Figura 2.8: Mecanismo propuesto por Schellmann y colaboradores para explicar el origen de la distribución de pelos en hoja (izquierda) y en raíz (derecha). Tomado de [36].

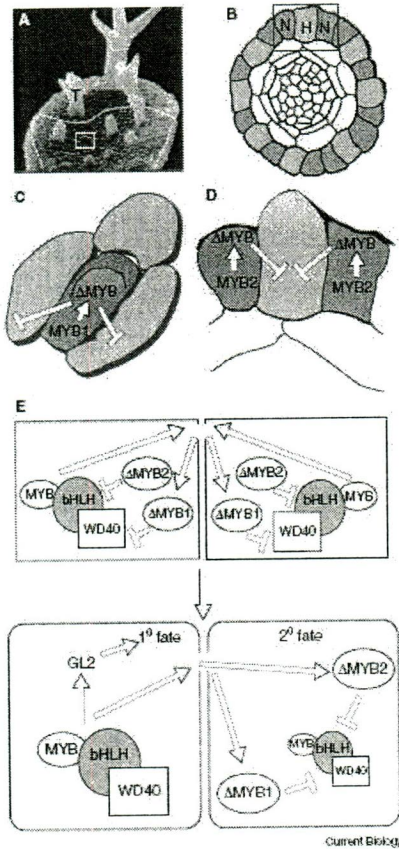


Figura 2.9: A y B ilustran los diferentes patrones observados en la distribución de pelos en hoja y raíz respectivamente. C y D son ampliaciones de las secciones encerradas en un recuadro en A y B. MYB1, GL1; MYB2, WER; AMYB1, TRY; AMYB2, CPC. E representa el modelo en que un complejo activador (MYB-bHLH-WD40) regula positivamente a GL2 y a los inhibidores. Los factores MYB inhiben al complejo activador, dando lugar a dos tipos celulares distintos.

en células vecinas.

El modelo representado en la figura 2.8 corresponde a la propuesta de Schellmann y colaboradores [36]. Se postula que el origen de los patrones de distribución de pelos en hoja y raíz tiene su base en un mecanismo de competencia mediado por *CPC* y *TRY*. En ambos casos, dicha competencia resulta en la activación de un grupo de activadores (*WER/GL1*, *TTG* y *GL3*) que regulan positivamente a *GL2*. Estos autores interpretan el sesgo posicional observado en epidermis de raíz como la consecuencia de una señal positiva proveniente de las células corticales y que es ligeramente más débil en la zona en que se encuentran los tricoblastos.

Finalmente, la figura 2.9 fue presentada por B. Scheres [37]. El autor considera un complejo activador de *GL2* conformado por las proteínas MYB, bHLH y WD40 y propone que un factor MYB (*TRY* o *CPC*) actúa como inhibidor lateral.

Es importante notar que, con el fin de representar los mecanismos de diferenciación que determinan la aparición de pelos, algunos autores han propuesto redes de regulación diferentes para los distintos tipos celulares. Sin embargo, los modelos que se propongan deben partir del hecho de que las redes son iguales para todas las células no diferenciadas y que la distinción entre tipos celulares depende de la forma en que interactúan tales redes, de los estados iniciales de sus elementos y del contexto celular.

Los modelos esquemáticos presetados hasta ahora son útiles para la integración y visualización de información generada por experimentos, sin embargo, son representaciones gráficas que no permiten abordar cuestiones sobre la dinámica que subyace la formación de heterogeneidades en la concentración de ciertas proteínas y, en última instancia la adquisición de un destino celular y la aparición de patrones en la distribución de tricomas y tricoblastos.

Como se mencionó antes, también se ha elaborado una propuesta más teórica que brinda una posible explicación para la aparición y mantenimiento de los patrones en expresión de genes que subyacen la formación de patrones en la distribución de pelos. Las redes de regulación descritas arriba para hoja y raíz presentan propiedades que sugieren que pueden ser entendidas como un sistema reactivo difusivo del tipo propuesto por Turing, Murray, Meinhardt y Gierer [32].

Por una parte, se han identificado genes o grupos de genes que actúan como activadores de *GL2*, que como ya se mencionó, es un gen directamente relacionado con la diferenciación de células epidérmicas. Las relaciones que establecen los genes activadores entre sí aún no se precisan, sin embargo, frecuentemente se consideran un complejo o bien, se considera la acción resultante de ellos como el elemento activador. Adicionalmente, se sabe que algunos de los genes aquí llamados activadores ejercen una regulación positiva también sobre los genes inhibidores *CPC* y *TRY*, y probablemente una positiva sobre los mismos activadores. En cuanto a la autoregulación positiva, no hay datos empíricos que la sustenten de manera directa, sin embargo, dado que los patrones de expresión de activadores e inhibidores se traslapan y que los primeros mantienen su expresión en presencia de los segundos, puede suponerse una autoactivación, ya sea directa o indirecta, de los activadores.

Pesch y Hulskamp [32] evaluaron la posibilidad de que las redes de regulación que interesan en este trabajo puedan ser representadas mediante un sistema de inhibición lateral como el propuesto por Meinhardt [23]. Para esto, consideraron las predicciones que se desprenden del modelo de Meinhardt y las compararon con la evidencia experimental disponible hasta ahora.

Como lo requiere el modelo mencionado, se ha encontrado que los activadores *TTG*, *WER*, *GL1* y *GL3*, participan en la regulación positiva de *CPC* y *TRY*, que han sido caracterizados como los inhibidores del sistema. Por otra parte, también se sabe que los inhibidores regulan negativamente a algunos de los genes descritos como activadores (ver secciones 2.1 y 2.2). También se ha mostrado que *CPC* (y no los activadores) se mueve de una célula a sus vecinas y que tiene un papel central en los procesos de inhibición lateral, lo que satisface otra de las condiciones necesarias para considerar este sistema uno similar a los propuestos por Meinhardt [23].

Uno de los aspectos indispensables para constatar la propuesta del sistema activador-inhibidor consiste en verificar que la dinámica de la red transcripcional completa puede efectivamente reducirse a la parte reactiva de un sistema del tipo activador-inhibidor.

Entre los trabajos relacionados con dinámica de redes de regulación genética, se distinguen dos enfoques en el estudio de estas cuestiones. Por un lado, se tiene el de los modelos continuos como el reactivo difusivo que se men-

cionó arriba y por otro, el del estudio de redes en que los nodos, genes en este caso, sólo pueden adquirir un número discreto de estados, mismos que dependen de los estados de los genes que los afectan positiva o negativamente (revisar [8, 25, 26] para ejemplos de este tipo de trabajos).

Estos dos enfoques presentan diferencias importantes: en un caso se detallan las funciones continuas de activación de los genes, mientras que en el otro se tratan como funciones lógicas. También son distintos porque en el contexto de reacción-difusión los mecanismos genéticos se reducen a un sistema activador-inhibidor compuesto únicamente por dos elementos, en tanto que en el enfoque de redes, se detallan las estructuras de las redes completas.

No obstante, estos enfoques no son excluyentes. De hecho, parece razonable acoplar redes booleanas simulando procesos tipo difusión semejantes a los mecanismos de comunicación celular reportados experimentalmente.

Uno de los objetivos del presente trabajo es precisamente elaborar un modelo de red trascricional que recupere los mecanismos relevantes de la subdiferenciación epidérmica en el ámbito intracelular y que a su vez sirva como punto de partida para la elaboración de un modelo en el que las redes celulares se integran mediante procesos difusivos. De esta manera, se simularía la difusión de proteínas como la codificada por *CPC*, mismas que al moverse hacia células vecinas modifican la expresión de algunos de los genes que conforman la red.

Asimismo, se ha propuesto modelar la red de regulación subyacente a la diferenciación de tricomas y tricoblastos mediante un sistema de ecuaciones como el propuesto por Turing. En este trabajo se considera la dinámica de dos “reactivos” o grupos de genes, activadores e inhibidores, y se muestra que dos sistemas de este tipo, aún con parámetros idénticos, pueden dar lugar a patrones espaciales distintos si el contexto celular es diferente, por ejemplo, si en uno de ellos actúa alguna señal química como aquella proveniente del córtex de raíz.

2.4. Parámetros *vs.* contexto celular

Como se mencionó, las redes de regulación que subyacen la aparición y distribución de pelos en epidermis de hoja y raíz de *Arabidopsis thaliana* son

muy similares entre sí, tanto estructural como funcionalmente. Éstas comparten genes o familias de genes y de hecho, la idea de que ambas redes constituyen un sistema de activador-inhibidor como los descritos por Meinhardt parece muy plausible (véase sección 1.4). Esto significa que los genes relacionados con la subdiferenciación y formación de patrones en epidermis podrían agruparse ya sea como activadores o como inhibidores.

No obstante las similitudes entre ambas redes, los patrones de distribución de pelos que resultan de la diferenciación epidérmica en cada caso son distintos; en raíz se observa un patrón bandeado mientras que en hoja los pelos se distribuyen homogéneamente sobre la superficie. Hasta ahora no se sabe con certeza qué es lo que ocasiona que redes tan parecidas den lugar a patrones espaciales distintos, pero se han propuesto dos mecanismos que pretenden explicar este fenómeno.

El primer mecanismo es el de *ajuste de parámetros* y de manera general plantea que las diferencias en los patrones espaciales están dadas por variaciones en los parámetros asociados a cada red. Por otra parte, el mecanismo de *contexto celular* sostiene que son los procesos de comunicación celular o señalización locales los que dan lugar a diferencias en la distribución de pelos. Ambos propuestas se comentan con más detalle a continuación.

Las redes de regulación genética están caracterizadas por algunos parámetros, por ejemplo, la tasa de síntesis o degradación de ciertas moléculas o el coeficiente de difusión de otras. Uno de los mecanismos planteados sugiere que las diferencias del ajuste fino de tales parámetros pueden explicar el origen de los patrones bandeado y homogéneo en la distribución de pelos. Sin embargo, la robustez ante cambios en valores de parámetros, perturbaciones y condiciones iniciales que caracterizan a las redes biológicas (*e.g.* [8]) parece contradecir esta hipótesis.

El otro mecanismo propuesto plantea que información contextual asociada, por ejemplo, a la geometría y tamaño de del dominio en que se llevan a cabo los procesos morfogénicos⁸ o a la señalización entre distintos tipos de tejidos, explican el origen de los patrones característicos de hoja y raíz. La relación entre la posición de las células H en raíz y la ACCW (ver sección

⁸En el caso de hoja se tiene una superficie casi plana, mientras que en raíz los tricoblastos se encuentran arreglados en una estructura cilíndrica

2.1) indica que la comunicación entre células vecinas puede producir un sesgo ordenado y que es un mecanismo importante en los procesos de diferenciación en este sistema, sin embargo, no se ha demostrado que sea necesario y suficiente para hacer la diferencia entre el patrón bandeado de raíz.

En términos de dinámica de redes, puede decirse que los mecanismos de señalización inicializan la red de tal manera que ésta se localiza en la cuenca de atracción de uno de los atractores y alcanza un estado de equilibrio correspondiente a cierto tipo celular.

La cuestión de cuáles son los mecanismos que dan lugar a los diferentes arreglos en la distribución de pelos, y la de cómo es que se fijó uno u otro mecanismo, constituyen un problema importante en el estudio del desarrollo y el origen de patrones espaciales en plantas y en general, en seres vivos. Es por ello que este trabajo se orienta, en parte, a obtener resultados que ayuden a distinguir entre las propuestas que se plantean arriba y que sirvan de base para plantear en el futuro modelos espaciales en contextos celularizados explícitos.

Como se verá adelante con mayor detalle, en este trabajo se plantean explícitamente y de manera detallada las redes correspondientes a los sistemas de hoja y raíz y se obtiene una red genérica que, salvo la de identidad más no la función de un nodo (*WER* o *GL1*), es igual para los dos casos. Así, uno de los objetivos de este trabajo es determinar si la misma red transcripcional puede generar los diferentes patrones de distribución de pelos en presencia de una señal dependiente de la posición para el caso de raíz. Esto se traduce en investigar si la presencia de señales o modificaciones en el acoplamiento de las redes son capaces de llevar a la red de un estado de equilibrio o atractor a otro.

Cabe mencionar que en los procesos de desarrollo y morfogénesis también intervienen factores como los hormonales o ambientales. En particular, se sabe que la señalización mediante etileno tiene un papel importante en este tipo de sistemas [24]. Sin embargo, en una primera etapa se considerará únicamente la red transcripcional. El tomar en cuenta factores hormonales, por ejemplo, permitiría responder más adelante a otro tipo de preguntas y formular predicciones comprobables mediante tratamientos farmacológicos en el laboratorio.

Las redes de regulación genética de hoja y de raíz pueden estudiarse como redes o “módulos” muy similares en términos de estructura y función. De hecho, parece muy razonable plantear una red genérica que represente a las dos (véase figura 2.10). Este enfoque permite abordar diversas cuestiones, en particular las referentes a mecanismos que dan lugar a patrones espaciales diferentes a partir de redes muy similares.

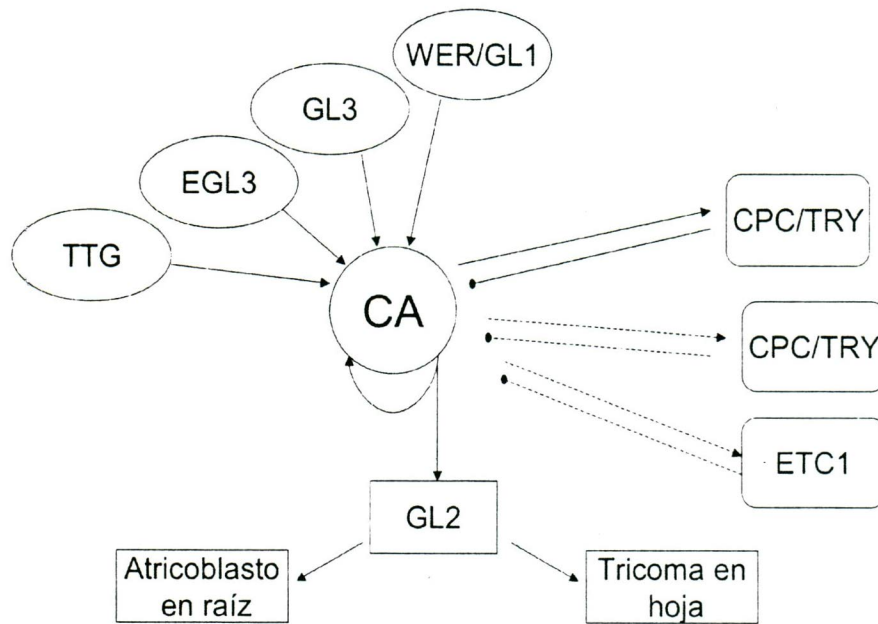


Figura 2.10: Representación gráfica de la propuesta de red transcripcional subyacente a la diferenciación celular en epidermis de *Arabidopsis thaliana*. Los genes activadores, GL1 en hoja y WER en raíz, TTG, GL3 y EGL3 integran el complejo activador C, mismo que se autorregula positivamente y activa a GL2. Los genes inhibidores TRY y CPC regulan negativamente al complejo C. En cada caso hay un inhibidor principal (líneas continuas) y uno secundario (líneas punteadas). En raíz, el principal es CPC, mientras que en hoja es TRY.

Capítulo 3

El modelo

3.1. Construcción y simulación de la red.

En este trabajo se propone un modelo de red transcripcional conformada por los genes asociados a subdiferenciación celular en epidermis de hoja y raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Dicho modelo fue elaborado a partir de los resultados experimentales reportados en la literatura. Se tomaron en cuenta resultados relativos a los patrones espacio temporales de expresión de los genes, al fenotipo de mutantes sencillos y múltiples, a datos de doble híbrido en levadura y se retomaron algunos aspectos de modelos previamente propuestos.

Así, partiendo de los datos experimentales presentados en secciones anteriores, se determinaron las interacciones entre genes. Los nodos que representan a los genes pueden tener dos (0,1) o tres (0,1,2) estados, dependiendo de la evidencia empírica disponible. En algunos casos, se tiene información sobre el efecto de la sobreexpresión de los genes; en tales casos se introdujo el tercer estado, 2. Los nodos que pueden adquirir tres estados son *WER/GL1*, *CPC* (en el caso de raíz), *TRY* (en hoja), *GL3* y *EGL3*.

Con el fin de ejemplificar la traducción de resultados experimentales a tablas que resumen las relaciones entre genes, se explicará cómo se determinaron las interacciones que afectan a *CAPRICE* (*CPC*). Las tablas completas se presentan en el apéndice A.

Como se mencionó antes, el fenotipo de los mutantes de pérdida y ganan-

Cuadro 3.1: Reglas para regulación positiva de *WER* sobre *CPC*

WER	CPC
0	0
1	1
2	2

cia de función de *CPC* y su patrón de expresión, entre otros experimentos, sugieren que este es uno de los genes que inhibe a genes activadores de *GL2* y a su vez, que *CPC* es activado por *WERWOLF*. Esta relación se indica en la tabla 3.1, ya que cuando *WER* está inactivo, es decir su estado es igual a cero, el de *CPC* también lo es y cuando *WER* está activo o sobreexpresado ($WER = 0$ o $WER = 1$ respectivamente) *CPC* también se activa o sobreexpresa.

Las interacciones entre genes también pueden presentarse de manera gráfica. De hecho, esta representación frecuentemente resulta útil para la elaboración de tablas. La figura 2.10 ilustra gráficamente las relaciones de una red genérica, que podría ser tanto la de hoja como la de raíz.

Tanto los resultados experimentales como su interpretación en algunos de los modelos previamente elaborados [36, 37], sugieren que los genes activadores de *GL2* constituyen un complejo activador. Aquí se retoma esta idea y se hace explícita la manera en que cada gen contribuye a la formación de dicho complejo, ya que se los experimentos indican que no todos lo hacen de igual forma. Por ejemplo, se sabe que la sobreexpresión de alguno de los genes bHLH (*GL3* o *EGL3*) puede recuperar la pérdida de función de *TTG*. Asimismo, la expresión de *WER* o *GL1* es indispensable para que el complejo funcione.

Debido a que se puede identificar un complejo activador tanto en hoja como en raíz y a que los genes que los conforman lo hacen prácticamente de la misma manera en ambos casos (salvo que en hoja *GL1* sustituye a *WER*), es posible elaborar una tabla que resuma las relaciones sobre un complejo activador, que bien podría ser el de hoja o el de raíz. La tabla 3.2 muestra el efecto de cada uno de los genes activadores sobre el complejo CA.

Cuadro 3.2: Los cuatro genes activadores (*GL1* en hoja y *WER* en raíz) determinan el estado del complejo activador CA. X indica que el gen puede estar en cualquier estado y no afecta el estado del CA.

WER/GL1	TTG	GL3	EGL3	CA
0	x	x	x	0
1	0	0	0	0
1	0	0	1	0
1	0	1	0	0
1	0	1	1	0
1	1	0	0	0
2	0	0	0	0
2	0	0	1	0
2	0	1	0	0
2	0	1	1	0
2	1	0	0	0
2	0	2	0	1
2	0	2	1	1
1	0	2	0	1
1	0	2	1	1
1	1	0	1	1
1	1	1	0	1
1	1	1	1	1
2	1	0	1	1
2	1	1	0	1
2	1	1	1	1
1	1	2	0	2
1	1	2	1	2
2	1	2	0	2
2	1	2	1	2

Por otra parte, se introduce un nodo llamado complejo inhibidor que integra, de acuerdo con las reglas que determinan su estado, el efecto de los inhibidores, *CPC*, *TRY* y *ETC1* (ver apndice A). Si bien no hay evidencia que indique que las proteínas codificadas por los genes inhibidores interactúen entre sí para formar un complejo, ya que estos tres genes son funcionalmente redundantes, es razonable resumir la acción de estos tres genes en un nodo.

Con el fin de determinar el número e identidad de los atractores de la dinámica de la red, se siguió la evolución de todas las posibles condiciones iniciales (17496), para lo cual se partió de cada una de las condiciones iniciales para iterar el sistema de acuerdo con las reglas descritas en las tablas hasta alcanzar un estado estacionario.

Dado que uno de los objetivos de este trabajo consiste en poner a prueba la propuesta de que la red completa se comporta como un sistema activador inhibidor, se simuló la dinámica de una red reducida a un complejo activador y a un complejo inhibidor que interactúan entre sí de acuerdo a las reglas de un sistema activador inhibidor típico. Al igual que para la red completa, se siguieron todas las posibles condiciones iniciales. En la siguiente sección se verá que los resultados obtenidos en ambos casos son compatibles entre sí.

Una manera de resumir y representar la información contenida en las tablas es traducirlas a reglas lógicas con los operadores AND, OR y XOR. Por ejemplo, para que el estado del complejo activador tome un valor igual a 2, es decir que se sobreexpresa, es necesario que *GL1* esté activo o sobreexpresado, que *GL3* esté sobreexpresado y que *TTG* esté activo¹. En este caso, el estado de *EGL3* no es relevante. La regla lógica que resume estas condiciones es la siguiente:

$$\text{Si } [(GL1 = 1 \vee GL1 = 2) \wedge GL3 = 2 \wedge TTG = 1] \implies CA = 2.$$

donde \vee es el operador lógico OR y \wedge , AND. En este ejemplo, dada la condición encerrada en corchetes, el nodo CA (complejo activador) adquiere el estado de activación 2.

¹Ya que no existe información suficiente sobre la sobreexpresión de *TTG*, en este modelo *TTG* sólo tiene dos estados, activo o inactivo, que corresponden respectivamente a 1 y 0 en las tablas.

El programa que sirvió de base para llevar a cabo tales simulaciones se elaboró en C y se anexa en el apéndice 2.

El modelo de red discreta se probó simulando las mutaciones de pérdida de función y las sobreexpresiones reportadas hasta ahora y verificando si los resultados obtenidos con el modelo son compatibles con la información experimental. También se realizaron simulaciones que contribuyeran a entender algunos resultados experimentales poco intuitivos. Los resultados y su interpretación se presentan en las siguientes secciones.

3.2. Resultados

Se llevaron a cabo simulaciones para todas las posibles condiciones de la red completa y se encontró que para una tercera parte de las condiciones iniciales el estado de los genes llega a un equilibrio en que todos toman un valor de 1 y que para el resto de las condiciones iniciales el sistema llega a un estado constante en que todos valen cero. En términos de la dinámica de la red puede decirse entonces que hay dos atractores (00...0 y 11...1) y que la cuenca de atracción del estado 0 es dos veces mayor que la del estado 1.

Es notable el hecho de que los estados 0 y 1 correspondan a los perfiles de expresión genética reportados para los dos tipos celulares, uno en que hay expresión de *GL2* y uno en que no la hay, mismos que corresponden a células NH y H en raíz y a células T y NT en hoja. Este resultado no sólo es compatible con los patrones de expresión reportados, es decir con el hecho de que los picos de expresión de activadores e inhibidores se traslapen, sino que también provee una explicación en términos de la estructura y dinámica de la red para este hecho.

Al mutar o sobreexpresar algunos de los genes, se modifican las propiedades dinámicas de la red. De hecho, se modifican la identidad de los atractores y el tamaño de las cuencas de atracción. En términos de las simulaciones, mutar o sobreexpresar consiste en asignar a uno de los genes un valor constante de cero o dos respectivamente, sin importar su relación con los otros genes.

Uno de los fenotipos no comprendidos totalmente hasta ahora es el de sobreexpresión de *WER*, que pese a estar asociado a una producción constitutiva de *WER*, no exhibe cambios aparentes en el número y arreglo de tricoblastos [18]. Al simular la sobreexpresión de este gen en el modelo mediante el mantenimiento de *WER* en un estado fijo de 2, se obtuvo lo siguiente. Si bien la configuración de los atractores se modifica ligeramente, no cambia el número de atractores ni la identidad celular a la que correspondería cada uno de ellos. En la simulación de sobreexpresión de *WER* (35S::*WER*), el atractor 11...1 se convierte en el 2111111, donde el *WER* es el único nodo con estado estacionario de 2. No obstante, la interpretación biológica de estos dos atractores es la misma, ya que en ambos se expresan de igual manera activador y los inhibidores, lo que resulta en la expresión de *GL2* y el la

determinación de uno de los dos tipos celulares descritos para epidermis de raíz en el tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana*.

Los resultados de simulación de mutaciones se resumen en la tabla 3.2. Como se puede ver, todos ellos coinciden con los experimentos reportados en la literatura. De hecho, el modelo recupera algunas relaciones sutiles, como la de redundancia parcial entre *GL3* y *EGL3*. En la tabla se ve que la simulación del mutante *gl3* reduce el número de condiciones iniciales que llevan al estado estacionario 11...1 y que el doble mutante *gl3 egl3* enfatiza este hecho, lo que es consistente con lo observado para estos dos genes. Si bien era de esperarse que el modelo recuperara los resultados experimentales con los cuales fue definido, éste también provee una predicción cuantitativa para cada genotipo de la probabilidad de que una célula aislada adquiera el destino de pelo (estos datos no existen en la literatura actualmente, pero de generarse constituirían una buena forma de poner a prueba el modelo). Asimismo, con ayuda del modelo es posible simular genotipos que no se han generado *in vivo* y de predecir su fenotipo, al menos en términos de la probabilidad mencionada arriba. Ejemplo de esto es la simulación de una línea en que se sobreexpresan *WER* y los genes bHLH, resultando en una probabilidad de 1 de convertirse en pelo (3.2).

Como se explicó en la sección anterior, también se propone un modelo reducido en que hay un complejo activador y uno inhibidor, CI, compuesto por los inhibidores *CPC*, *TRY* y *ETC1*. Se realizaron simulaciones de la dinámica y se encontró que en este caso todas las condiciones iniciales excepto una (11) llegan al estado en 00, es decir, aquél en que ninguno de los complejos está activo (3.2).

Al igual que para la red completa, en el sistema reducido se identificaron dos atractores, cada uno de los cuales corresponde a los perfiles de expresión reportados para los dos tipos celulares de epidermis. Más aún, también en este caso, la cuenca de atracción del estado 00 es mucho mayor a la del 11. Este hecho sugiere que la red completa efectivamente puede mantener una equivalencia cualitativa con la parte reactiva de un sistema activador-inhibidor.

En la figura 3.1 se compara la dinámica de la parte reactiva de un sistema activador-inhibidor típico, con la parte reactiva del mismo sistema pero

Cuadro 3.3: Porcentaje de condiciones iniciales que llevan al atractor 11...1. Las cursivas indican simulación de pérdida de función y el 35S indica sobrexpresión. Los resultados para *GL1* son iguales que para *WER*. En el caso de raíz (donde actúa *WER*) el atractor 11...1 corresponde a no-pelo, mientras que en hoja (donde participa *GL1*) este mismo atractor corresponde a pelo o tricoma. El total de condiciones iniciales del sistema, de las cuales se probaron todas, es 17496.

"Genotipo"	% de c.i. que llevan a $GL2 = 1$
Tipo silvestre	33.33
<i>wer</i>	0
<i>gl3</i>	16.67
<i>gl3 egl3</i>	0
35S:GL3, 35S:EGL3	62.5
35S:WER	47.22
<i>cpc</i>	40.74
35S:CPC	18.51
<i>cpc try etc1</i>	40.74
35S:CPC, TRY, ETC1	0
35S:WER, 35S:GL3EGL3	100
35S:TTG	33.33
<i>ttg</i>	0

Cuadro 3.4: Estados de equilibrio para la red conformada únicamente por los complejos activador (A) e inhibidor (I).

A I	A I
0 0	0 0
0 1	0 0
0 2	0 0
1 0	0 0
1 1	1 1
1 2	0 0
2 0	0 0
2 1	0 0
2 2	0 0

discretizado y con la dinámica definida por las reglas de la red reducida. Como se ve, el comportamiento de los tres sistemas es comparable y, aparentemente, equivalente en términos cualitativos de la dinámica. Ya que la red reducida recupera aspectos relevantes de la dinámica de la red completa y, por otro lado, es comparable con la parte reactiva de un sistema activador inhibidor, la hipótesis de que la red subyacente a la determinación del tipo celular en epidemias se comporta como un sistema activador inhibidor es muy plausible.

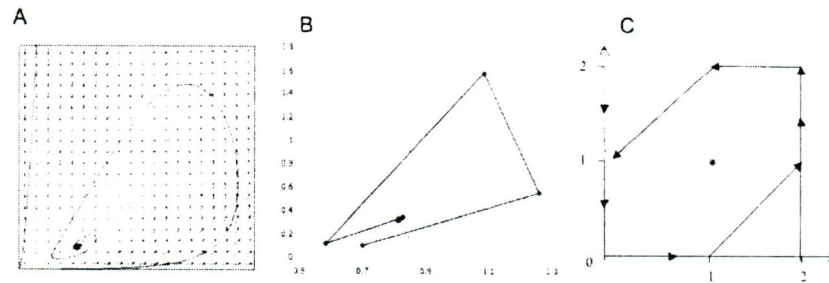


Figura 3.1: Las trayectorias para el la red con únicamente un elemento activador y un inhibidor (C) es cualitativamente equivalente (en la medida que un sistema discreto puede reproducir uno continuo y viceversa) a aquella de la parte reactiva de un sistema típico activador-inhibidor (A) y a aquella obtenida de la discretización de un sistema típico activador-inhibidor (B).

Capítulo 4

Discusión

Como se mencionó brevemente en la sección anterior, la dinámica de las redes completa y la compuesta por un complejo activador y dos inhibidores presenta dos estados de equilibrio. El primero de ellos es aquél en que no se expresa ninguno de los genes de la red y, por lo tanto, tampoco *GL2*. En términos de desarrollo, este estado estaría asociado al tipo celular pelo en raíz y a no-pelo en hoja. El otro estado de equilibrio es aquél en que los dos genes inhibidores y el CA se expresan normalmente, al igual que *GL2*, y puede asociarse a los tipos celulares no-pelo y pelo en raíz y hoja respectivamente. Ya que el número e identidad se mantiene en las dos redes, el modelo sugiere que la red completa se comporta cualitativamente como la parte reactiva de un sistema típico activador-inhibidor. De ser así, el acoplamiento de las redes celulares vía la difusión o transporte de alguno o algunos de sus elementos podría explicar el origen y mantenimiento de las heterogeneidades en concentración que dan lugar a los patrones observados en los sistemas epidérmicos de *Arabidopsis thaliana*. Ya que se tiene evidencia empírica que demuestra que la proteína codificada por uno de los componentes de la red, el inhibidor *CPC*, se mueve entre células vecinas a través de los plasmodesmos, parece razonable que pensar que efectivamente el mecanismo que subyace la aparición de los arreglos celulares en hoja y raíz es del tipo activador-inhibidor.

Pese a que en el modelo de red aquí presentado se consideran dos complejos, el activador y el inhibidor, se hace explícito el efecto de cada uno de los seis genes involucrados. Esto permite hacer inferencias no sólo respecto

al sistema activador-inhibidor, sino también respecto al efecto de los genes individuales en la determinación del tipo celular. Fue posible, por ejemplo, reproducir aspectos relevantes de los mutantes simples y múltiples reportados en la literatura. Además, este tipo de análisis permite simular el efecto de genotipos no reportados y hacer una propuesta respecto a la naturaleza de la señal proveniente del córtex en raíz.

La señal proveniente del córtex podría sesgar la determinación del tipo celular en raíz de cuatro formas; activando a los activadores o inhibiendo los inhibidores en las filas que dan lugar a no-tricoblastos, o bien, inhibiendo a los activadores o activando a los inhibidores en las filas de tricoblastos¹. En cualquiera de los casos, la señal debe ser capaz de llevar al sistema a uno de los dos atractores de manera inequívoca, esto es, debe sesgar las condiciones iniciales de tal manera que todas las células bajo su efecto, es decir, todas las células de ciertas filas, se desarrollen siempre como trico o atricoblasto.

Se presentaron los resultados de simulaciones de mutantes de pérdida de función y de sobreexpresión para los genes involucrados en la determinación del tipo celular en epidermis. De estos resultados, destacan aquéllos en que la pérdida de función o sobreexpresión de algún elemento (o de una combinación de elementos) lleva a la totalidad de condiciones iniciales al mismo atractor. Este tipo de alteraciones son las que podrían estar asociadas a la acción de una señal proveniente del córtex en raíz. Estas alteraciones son las siguientes: la pérdida de función de *WER*, de *TTG* y de *GL3* y *EGL3* (estas dos últimas juntas) y la sobreexpresión múltiple de *WER*, *GL3* y *EGL3*.

Los resultados sugieren fuertemente, que la señal cortical afecta directamente la formación del complejo activador y parecen apoyar la hipótesis, recientemente planteada, de que una señal proveniente del córtex actúa sobre alguno de los genes activadores (por ejemplo, *WER*) y acotan los posibles experimentos que podrían realizarse para tratar de caracterizar el efecto de la información posicional sobre la red de regulación genética.

Los resultados reportados (tabla 3.2) apuntan a que muchas de las alteraciones sobre elementos de la red, llevarían a modificar el tamaño de las

¹Recuérdese que, contrario a lo que se observa en hoja, la expresión del CA y, por lo tanto de *GL2*, en raíz determina el tipo celular no pelo, mientras que su ausencia caracteriza a las células que darán lugar a tricoblastos.

cuencas de atracción de la red, y no necesariamente a una transformación total de todas las células epidérmicas en un mismo tipo celular. Esto es compatible con los fenotipos observados en experimentos, ya que éstos generalmente consisten en un aumento o disminución en el número de pelos, pero no en la unificación del tipo celular en la epidermis.

Las redes de regulación genética de hoja y raíz se representaron como una misma red genérica (figura 2.10), que a su vez puede reducirse a un sistema activador-inhibidor manteniendo las principales propiedades dinámicas (*i.e.* número y cualidad de los atractores). Esto, aunado a la discusión que se hace arriba sobre el efecto de una posible señal externa, sugiere que el contexto celular (características anatómicas, geométricas o de comunicación celular que podrían actuar sobre o en paralelo a la red genética en la formación de arreglos celulares) es relevante en el proceso de subdiferenciación epidérmica. Más aún, el que redes equivalentes puedan generar patrones celulares contrastantes, dependiendo del órgano o contexto en que se encuentren, sugiere que la combinación o ubicación en diferentes contextos de módulos genéticos bien conservados puede ser la base de las innovaciones evolutivas. Sin embargo, aún es necesario probar el efecto de la variación de parámetros como el coeficiente de difusión en un sistema de redes acopladas.

El sistema compuesto por el complejo activador y el inhibidor cumple con otras de las condiciones mencionadas en la sección 1.4. El complejo activador, o bien, algunos de los genes que lo conforman, presenta autorregulación positiva y el coeficiente de difusión del inhibidor es mayor que el del activador. De hecho, hasta ahora sólo hay evidencia empírica del movimiento del inhibidor.

Esto, aunado a los resultados aquí presentados, sugiere que los modelos del tipo reacción difusión efectivamente pueden ser utilizados para tratar de explicar la formación de cierto tipo de patrones en la distribución de pelos en la epidermis de hoja o raíz de *Arabidopsis thaliana* y alienta la elaboración de modelos espaciales en que se acoplen redes como las que aquí se plantean mediante procesos que simulen difusión.

El modelo aquí presentado es aplicable únicamente a aspectos locales, es decir, a la escala celular. Sin embargo, es posible tomar estas redes como base para la elaboración de un modelo en la escala multicelular. En tal modelo,

se consideraría la dimensión espacial, por lo que podrían referirse cuestiones relativas a la formación de patrones en la distribución de pelos y podrían caracterizarse los fenotipos no sólo en términos del número sino también de la distribución en el espacio de los distintos tipos celulares. Un modelo de esta naturaleza seguramente contribuiría a esclarecer algunos aspectos de la discusión sobre las hipótesis evolutivas plateadas en la sección 2.4 y permitiría evaluar la importancia de los parámetros del sistema en la aparición y distribución de pelos.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el enfoque de los sistemas complejos, en particular los modelos dinámicos de redes, pueden ser sumamente útiles para entender cómo la acción concertada de varios elementos que interactúan entre sí subyace procesos del desarrollo. En este caso, este tipo de modelos ha sido útil para proponer una explicación dinámica de por qué los dos tipos celulares de epidermis en raíz, y dos de los observados en hoja aparecen de manera robusta pese a perturbaciones ambientales. Asimismo, este trabajo sugiere que, al menos para la determinación de tipos celulares, no es necesario un gen o un elemento que dirija la dinámica del sistema, sino que los perfiles de expresión genética característicos de los tipos celulares se alcanzan debido a la actividad colectiva de un grupo de genes.

Ya que la teoría y métodos desarrollados en el marco de los sistemas complejos puede llevarse al estudio de muy diversos problemas en biología, es posible que modelos como el presentado en este trabajo contribuyan al entendimiento no sólo de procesos de desarrollo, sino también al entendimiento de la evolución de estos procesos, de las formas orgánicas, y, por lo tanto, de los seres vivos.

Apéndice A

Tablas y reglas lógicas

Cuadro A.1: Reglas para la red completa 1. Los cuatro genes activadores (*GL1* en hoja y *WER* en raíz) determinan el estado del complejo activador CA. X indica que el gen puede estar en cualquier estado.

WER/GL1	TTG	GL3	EGL3	CA
0	x	x	x	0
1	0	0	0	0
1	0	0	1	0
1	0	1	0	0
1	0	1	1	0
1	1	0	0	0
2	0	0	0	0
2	0	0	1	0
2	0	1	0	0
2	0	1	1	0
2	1	0	0	0
2	0	2	0	1
2	0	2	1	1
1	0	2	0	1
1	0	2	1	1
1	1	0	1	1
1	1	1	0	1
1	1	1	1	1
2	1	0	1	1
2	1	1	0	1
2	1	1	1	1
1	1	2	0	2
1	1	2	1	2
2	1	2	0	2
2	1	2	1	2

Cuadro A.2: Reglas para la red completa 2. Los genes inhibidores conforman un complejo inhibidor.

TRY	CPC	ETCI	CI
0	0	0	0
0	0	1	0
0	1	0	0
0	1	1	1
1	0	0	1
1	0	1	1
1	1	0	1
1	1	1	1
2	0	0	1
2	0	1	2
2	1	0	2
2	1	1	2

Cuadro A.3: Reglas para la red completa 3. Reglas para la interacción de los complejos activador e inhibidor

CI	CA	CA
0	X	CA
1	0	0
2	0	0
1	1	1
2	1	0
1	2	1
2	2	1

Cuadro A.4: Reglas para la red completa 4. El CA determina la actividad de los genes activadores *TTG*, *GL3*, *EGL3* y *GL1* en hoja o *WER* en raíz y de los inhibidores. En hoja *TRY* puede tomar tres estados y *CPC* dos, mientras que en raíz *CPC* puede tomar tres y *TRY* sólo dos. Aquí se presentan las reglas para hoja, pero las de raíz son equivalentes.

CA	GL1	GL3	EGL3	TTG	CPC	TRY	ETC1
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	1	1	2	1

Cuadro A.5: Reglas de interacción entre el complejo inhibidor (CI) y el complejo activador (CA) para la red reducida.

CA CI	CA CI
0 0	0 0
0 1	0 0
0 2	0 0
1 0	2 1
1 1	1 1
1 2	0 1
2 0	2 2
2 1	2 2
2 2	1 2

Apéndice A

Código fuente

El siguiente código corresponde a un programa elaborado en lenguaje de programación C. Este programa y algunas variaciones del mismo, se usaron para llevar a cabo simulaciones de la dinámica de las redes transcripcionales que se modelan en este trabajo. Las reglas lógicas utilizadas para la elaboración del siguiente código corresponden a las que se presentan en el apéndice A.

```
#include<stdio.h>
#include<math.h>
#include<stdlib.h>
#include<time.h>
/*Este programa simula una red de regulacion genetica
en que cada nodo representa un gen, mismo que puede
tener dos o tres estados, 0, 1 o 0, 1, y 2.
Los genes interactuan segun ciertas reglas logicas
hasta que alcanzan un estado estable. Se explora el
numero y configuracion de los atractores de la red,
asi como el tamano de sus cuencas de atraccion.
Para ello, se registra cual es el atractor al que
llegan todas las posibles configuraciones iniciales
de la red*/
```

```
int *CreaVector(int *x, int dim)
/*Crea todos los vectores de configuracion
posibles, uno cada vez que se llama la funcion.
La posicion de los genes en el vector de
configuraciones y su estado maximo es:
wer=2, gl3=2, egl3=2, ci=2, ca=2, cpc=2,
caint=2, ttg=1, try=1, etc=1*/

int i,j,k,v;
int *y=x;
int Xmax[dim]; /*contiene el edo. maximo de cada gen*/
for (j=0;j<=6;j++) Xmax[j]=2;
for (j=7;j<=dim;j++) Xmax[j]=1;

void RELLENA(int b){
    int c;
    if (b < dim)
        for (c = b + 1; c < dim; c++)
            y[c] = x[c];
    return;
}

for(v = 0; v <= dim; v++){
    if (x[v] < Xmax[v]) {
        y[v] = 1 + x[v];
        RELLENA(v);
        break;
    }
    else y[v] = 0;
}
return y; //regresa el vector con el estado inicial de cada nodo
}
```

```

int *itera(int *z, int dim, int ite){
/*itera el vector dado de acuerdo con
las reglas de interaccion entre genes*/
int i,n,j,m;
int *w=(int *)malloc((dim)*sizeof(int));
//crea el vector de configuraciones
for (j=0;j<=dim;j++)w[j]=0;
for(i=0;i<=ite;i++) {

/*aqui van las reglas de la red, se itera de z a w
la posicion de los genes en el vector es:
gl1 0, gl3 1, egl3 2, ci 3, ca 4, try 5,
caint 6, ttg 7, cpc 8, etc 9*/

/*Reglas para el Complejo Activador*/
if (z[0]==0)w[6]=0;
if (z[0]==1&&z[1]==0&&z[2]==0&&z[7]==0)w[6]=0;
if (z[0]==1&&z[1]==0&&z[2]==0&&z[7]==1)w[6]=0;
if (z[0]==1&&z[1]==0&&z[2]==1&&z[7]==0)w[6]=0;
if (z[0]==1&&z[1]==0&&z[2]==1&&z[7]==1)w[6]=1;
if (z[0]==1&&z[1]==0&&z[2]==2&&z[7]==0)w[6]=0;
if (z[0]==1&&z[1]==0&&z[2]==2&&z[7]==1)w[6]=1;
if (z[0]==1&&z[1]==1&&z[2]==0&&z[7]==0)w[6]=0;
if (z[0]==1&&z[1]==1&&z[2]==0&&z[7]==1)w[6]=1;
if (z[0]==1&&z[1]==1&&z[2]==1&&z[7]==0)w[6]=0;
if (z[0]==1&&z[1]==1&&z[2]==1&&z[7]==1)w[6]=1;
if (z[0]==1&&z[1]==1&&z[2]==2&&z[7]==0)w[6]=1;
if (z[0]==1&&z[1]==1&&z[2]==2&&z[7]==1)w[6]=1;
if (z[0]==1&&z[1]==2&&z[2]==0&&z[7]==0)w[6]=0;
if (z[0]==1&&z[1]==2&&z[2]==0&&z[7]==1)w[6]=1;
if (z[0]==1&&z[1]==2&&z[2]==1&&z[7]==0)w[6]=1;
if (z[0]==1&&z[1]==2&&z[2]==1&&z[7]==1)w[6]=1;
if (z[0]==1&&z[1]==2&&z[2]==2&&z[7]==0)w[6]=1;
if (z[0]==1&&z[1]==2&&z[2]==2&&z[7]==1)w[6]=2;

```

```

if (z[0]==2&&z[1]==0&&z[2]==0&&z[7]==0)w[6]=0;
if (z[0]==2&&z[1]==0&&z[2]==0&&z[7]==1)w[6]=0;
if (z[0]==2&&z[1]==0&&z[2]==1&&z[7]==0)w[6]=0;
if (z[0]==2&&z[1]==0&&z[2]==1&&z[7]==1)w[6]=1;
if (z[0]==2&&z[1]==0&&z[2]==2&&z[7]==0)w[6]=0;
if (z[0]==2&&z[1]==0&&z[2]==2&&z[7]==1)w[6]=1;
if (z[0]==2&&z[1]==1&&z[2]==0&&z[7]==0)w[6]=0;
if (z[0]==2&&z[1]==1&&z[2]==0&&z[7]==1)w[6]=1;
if (z[0]==2&&z[1]==1&&z[2]==1&&z[7]==0)w[6]=0;
if (z[0]==2&&z[1]==1&&z[2]==1&&z[7]==1)w[6]=1;
if (z[0]==2&&z[1]==1&&z[2]==2&&z[7]==0)w[6]=1;
if (z[0]==2&&z[1]==1&&z[2]==2&&z[7]==1)w[6]=2;
if (z[0]==2&&z[1]==2&&z[2]==0&&z[7]==0)w[6]=0;
if (z[0]==2&&z[1]==2&&z[2]==0&&z[7]==1)w[6]=2;
if (z[0]==2&&z[1]==2&&z[2]==1&&z[7]==0)w[6]=1;
if (z[0]==2&&z[1]==2&&z[2]==1&&z[7]==1)w[6]=2;
if (z[0]==2&&z[1]==2&&z[2]==2&&z[7]==0)w[6]=2;
if (z[0]==2&&z[1]==2&&z[2]==2&&z[7]==1)w[6]=2;

```

/*Reglas para el Complejo Inhibidor*/

```

if(z[5]==0&&z[8]==0&&z[9]==0) w[3]=0;
if(z[5]==0&&z[8]==0&&z[9]==1) w[3]=0;
if(z[5]==0&&z[8]==1&&z[9]==0) w[3]=0;
if(z[5]==0&&z[8]==1&&z[9]==1) w[3]=1;
if(z[5]==1&&z[8]==0&&z[9]==0) w[3]=1;
if(z[5]==1&&z[8]==0&&z[9]==1) w[3]=1;
if(z[5]==1&&z[8]==1&&z[9]==0) w[3]=1;
if(z[5]==1&&z[8]==1&&z[9]==1) w[3]=1;
if(z[5]==2&&z[8]==0&&z[9]==0) w[3]=1;
if(z[5]==2&&z[8]==0&&z[9]==1) w[3]=2;
if(z[5]==2&&z[8]==1&&z[9]==0) w[3]=2;
if(z[5]==2&&z[8]==1&&z[9]==1) w[3]=2;

```

```

//reglas de CI vs. CA

if(w[3]==0) w[4]=w[6];
if(w[6]==0&&w[3]==1)w[4]=0;
if(w[6]==0&&w[3]==2)w[4]=0;
if(w[6]==1&&w[3]==1)w[4]=1;
if(w[6]==1&&w[3]==2)w[4]=0;
if(w[6]==2&&w[3]==1)w[4]=1;
if(w[6]==2&&w[3]==2)w[4]=1;

// reglas para todo lo que depende del Complejo Activador
if(w[4]==0||w[4]==1) w[5]=w[8]=w[9]=w[0]=w[7]=w[1]=w[2]=w[4];
if(w[4]==2){
w[8]=w[9]=w[7]=1;
w[5]=w[0]=w[1]=w[2]=2;
}

for (m=0;m<=dim;m++) printf("%d",w[m]);
printf(" ");
for (n=0;n<=dim;n++) z[n]=w[n];
/* Aqui el vector resultante de la iteracion se convierte
en semilla para la siguiente iteracion */

}
puts("");
free(w); //se libera la memoria del vector de configs.
}

main(){
int dim=9,i,j,k,m,n; /*dim es el numero de genes*/
int configs=17496;
/*numero de configuraciones iniciales por probar*/
int ite=100;
/*numero de iteraciones que se efectuan sobre cada c.inic.*/

```

```
/* aqui se crea, se itera y se imprimen el vector 000... y
se itera hasta llegar a su atractor*/
int *x=(int *)malloc((dim)*sizeof(int));
for (j=0;j<=dim;j++)x[j]=0;
for (i=0;i<=dim;i++) printf("%d",x[i]);
printf(" ");
int *z=(int *)malloc((dim+1)*sizeof(int));
for (n=1;n<=dim;n++) z[n]=x[n];
itera(z,dim,ite);

/*despues del 000... se crean e iteran todas las configuraciones
iniciales posibles, imprimiendo el vector inicial y la ultima
o ultimas iteraciones.*/
for (k=1;k<=configs;k++){
    x=CreaVector(x,dim);//hace el vector
    for (m=0;m<=dim;m++)printf("%d",x[m]);
printf(" ");
    for (n=0;n<=dim;n++) z[n]=x[n];
    itera(z,dim,ite);//itera de acuerdo con las reglas
}
free(x);
free(z);
} //FIN
```

Bibliografía

- [1] W. Arthur, *The emerging conceptual framework of evolutionary developmental biology*, Nature **415** (2002), 757–764.
- [2] A.L. Barabási, *Linked: The new science of networks*, Perseus Publishing, USA, 2002.
- [3] A.L. Barabási and R. Albert, *Emergence of Scaling in Random Networks*, Science **286** (1999), 509–512.
- [4] F. Berger, J. Haseloff, J. Schiefelbein, and L. Dolan, *Positional information in root epidermis is defined during embryogenesis and acts in domains with strict boundaries.*, Curr. Biol. **8** (1998), 421–430.
- [5] F. Berger, C.Y. Hung, L. Dolan, and J. Schiefelbein, *Control of cell division in the root epidermis of Arabidopsis thaliana.*, Dev. Biol. **194** (1998), 235–245.
- [6] C. et al Bernhardt, *The bhlh genes glabra3 (gl3) and enhacer of glabra 3 (egl3) specify epidermal cell fate in the Arabidopsis root.*, Development **130 (26)** (2003), 6431-6439.
- [7] Peter Bowler, *Historia fontana de las ciencias ambientales*, Fondo de Cultura Económica, 1998.
- [8] C. Espinosa-Soto, P. Padilla-Longoria, and E. Álvarez-Buylla, *A gene regulatory network model for cell-fate determination during arabidopsis thaliana flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles*, Plant Cell **16** (2004), 2923-2933.

- [9] Misra S. Hulskamp, M. and G. Jurgens, *Genetic dissection of trichome cell development in Arabidopsis*, Cell **76** (1994), 555-566.
- [10] S. Kauffman, *Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets.*, J. theor. Biol. **22** (1969), 437-467.
- [11] Stuart A. Kauffman, *The origins of order. self organization and selection in evolution.*, Oxford University Press, 1993.
- [12] I. Kim and P. Zambryski, *Cell-to-cell communication via plasmodesmata during arabidopsis embryogenesis*, Curr. Opin. Plant Biol. **8** (2005), 593-599.
- [13] V. Kiriki, M. Simon, K. Wester, J. Schiefelbein, and M. Hulskamp. *Enhancer of try and cpc2 (etc2) reveals redundancy in the region-specific control of trichome development of Arabidopsis.*, Plant Mol. Biol. **00** (2004), 1-10.
- [14] E.V. Koonin, Y.I. Wolf, and G.P. Karev, *The structure of the protein universe and genome evolution*, Nature **420** (2002), 218-223.
- [15] J.C. Larkin, D.M. Marks, J. Nadeau, and F. Sack, *Epidermal cell fate and patterning in leaves.*, Plant Cell **9** (1997), 1109-1120.
- [16] J.C. Larkin, D.G. Oppenheimer, A. Lloyd, E.T. Paparozzi, and M.D. Marks, *The roles of GLABROUS1 and TRANSPARENT TESTA GLABRA genes in Arabidopsis trichome development.*, Plant Cell **6** (1994), 1065-1076.
- [17] J.C. Larkin, N. Young, M. Prigge, and D.M. Marks, *The control of trichome spacing and number in Arabidopsis*, Development **122** (1996), 997-1005.
- [18] M. Lee and J. Schiefelbein, *Cell Pattern in the Arabidopsis Root Epidermis Determined by Lateral Inhibition with Feedback*, Plant Cell **14** (2002), 611-618.

- [19] M.M. Lee and J. Schiefelbein, *Werewolf, a MYB-related protein in Arabidopsis, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning.*, Cell **99** (1999), 473–483.
- [20] M.D. Marks and J. Esch, *Initiating inhibition*, EMBO reports **4** (2003), 24–25.
- [21] J.D. Masucci, W.G. Rerie, D.R. Foreman, M. Zhang, M.E. Galway, M.D. Marks, and J.W. Schiefelbein, *The homeobox gene GLABRA2 is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of Arabidopsis thaliana.*, Development **122** (1996), 1253–1260.
- [22] H. Meinhardt, *A model for pattern formation of hypostome, tentacles, and foot in Hydra: How to form structures close to each other, how to form them at distance.*, Dev. Biol. **157** (1993), 321–333.
- [23] H. Meinhardt, A.-J. Koch, and G. Bernasconi, *Models of pattern formation applied to plant development*, Symmetry in plants. (R. Jean and D. Barabé, eds.), Series in Mathematical Biology and Medicine Vol. 4, World Scientific, 1998, pp. 723–758.
- [24] L. Mendoza and E. Alvarez-Buylla, *Dynamics of the genetic regulatory network of Arabidopsis thaliana flower morphogenesis*, J. Theor. Biol. **193** (1998), 307–319.
- [25] ———, *Genetic regulation of root hair development in Arabidopsis thaliana: a network model*, J. Theor. Biol. **204** (2000), 311–326.
- [26] L. Mendoza, D. Thieffry, and E. Alvarez-Buylla, *Genetic control of flower morphogenesis in Arabidopsis thaliana: a logical analysis*, Bioinformatics **15** (1999), 593–606.
- [27] E. Meyerowitz, *Plants compared to animals: The broadest comparative study of development*, Science **295** (2002), 1482–1485.
- [28] R. Milo, S. Shen-Orr, S. Itzkovitz, N. Kashtan, D. Chklovskii, and U. Alon, *Network Motifs: Simple Building Blocks of Complex Networks*, Science **298** (2002), 824–827.

- [29] P. Miramontes and J.L. Gutiérrez, *El origen de las formas vivas: de Geoffroy Saint-Hilaire a D'Arcy Thompson*, En clásicos de la biología matemática. Faustino Sánchez, Pedro Miramontes y José Luis Gutiérrez (coords.), Siglo Veintiuno editores., 2002.
- [30] F. Nijhout, *Origination of organismal form (g. muller y s. newman, eds.)*, ch. 10. Gradients, diffusion and genes in pattern formation., pp. 165–181, MIT Press, 2002.
- [31] T.C. Payne, F. Zhang, and A.M. Lloyd, *GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in Arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1.*, Genetics **156** (2000), 1349–1362.
- [32] M. Pesch and M. Hülskamp, *Creating a two-dimensional pattern de novo during Arabidopsis trichome and root hair initiation.*, Current opinion in genetics and development **14** (2004), 422–427.
- [33] I. Salazar-Ciudad and J. Jernvall, *A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **99** (2002), 8116–8120.
- [34] I. Salazar-Ciudad, R.V. Solé, and S.A. Newman, *Phenotypic and dynamical transitions in model genetic networks II. Application to the evolution of segmentation mechanisms*, Evol. Dev. **3** (2001), 95–103.
- [35] I. Salazar-Ciudad, S. Newman, and R. Solé, *Phenotypic and dynamical transitions in model genetic networks I. Emergence of patterns and genotype-phenotype relationships*, Evol. Dev. **3** (2001), 84–94.
- [36] S. Schellmann, A. Schnittger, V. Kirik, T. Wada, K. Okada, A. Beermann, J. Thumfahrt, G. Jürgens, and Hülskamp. M., *TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in Arabidopsis*, EMBO J. **21** (2002), no. 19, 5036–5046.
- [37] B. Scheres, *Plant patterning: TRY to inhibit your neighbors.*, Curr.Biol. **12** (2002), R804–R806.

- [38] J. Schiefelbein, *Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot*, *Curr. Opin. Plant Biol.* **6** (2003), 74–78.
- [39] A. Schnittger, U. Folkers, B. Schwab, G. Jürgens, and M. Hulskamp, *Generation of a spacing pattern: the role of TRIPTYCHON in trichome patterning in Arabidopsis.*, *Plant Cell* **11** (1999), 1105–1116.
- [40] R.V. Solé, I. Salazar-Ciudad, and S.A. Newman, *Gene network dynamics and the evolution of development*, *TREE* **15** (2000), 479–480.
- [41] S.H. Strogatz, *Exploring complex networks*, *Nature* **410** (2001), 268–276.
- [42] D.B. Szymanski, R.A. Jilk, S.M. Pollock, and M.D. Marks, *Control of GL2 expression in Arabidopsis leaves and trichomes*, *Development* **125** (1998), 1161–1171.
- [43] L. Taiz and E. Zeiger, *Plant physiology*, ch. 16. Growth, Development and differentiation, 2002.
- [44] D'Arcy Wenworth Thompson Thompson, *On growth and form*, Cambridge University Press, U.K., 1992.
- [45] A.M. Turing, *The chemical basis of morphogenesis*, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **237** (1952).
- [46] T. Wada, T. Kurata, R. Tominaga, Y. Koshino-Kimura, T. Tachibana, K. Goto, M.D. Marks, Y. Shimura, and K. Okada, *Role of a positive regulator of root hair development, CAPRICE, in Arabidopsis root epidermal cell differentiation*, *Development* **129** (2002), 5409–5419.
- [47] F. et al. Zhang, *A network of redundant bhlh proteins functions in all ttg1-dependent pathways of Arabidopsis*, *Development* **130(20)** (2003), 4859–4869.





IMPRESA DIGITAL

IMPRESA OFFSET PLOTADO TESIS

Medicina 56, Esq. Medicina

Copilco Universidad

C.P. 04360, Coyoacan, México, D.F.

TEL. 5659 0009

imprentadigital@prodigy.net.mx