



Biología de Sistemas y su aplicación en Biología Celular y Molecular.

Luis S. Mayorga

Área de Biología Celular y Molecular. Departamento de Morfofisiología., Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Instituto de Histología y Embriología de Mendoza, Dr. Mario H. Burgos (IHEM), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Logros y limitaciones en Biología Celular y Molecular

La ciencia moderna ha dado claras muestras de que puede manipular el mundo celular obteniendo resultados maravillosos e inimaginables hasta hace unos pocos años. Por ejemplo, podemos hacer que una bacteria sintetice una proteína humana o que una hormona aparezca en la leche de una vaca. Podemos lograr plantas que resisten herbicidas y por lo tanto son más fáciles de cultivar o huevos con bajo contenido de colesterol. Podemos esto y mucho más manipulando los mecanismos moleculares a medida que vamos teniendo idea de cómo funcionan. Pero la palabra que usamos es manipular y no controlar. Porque nuestras manipulaciones son por ahora burdas y no un control acabado de los procesos celulares. Somos capaces de inhibir alguna reacción o activar otra. Podemos introducir nuevos elementos (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos) en una célula, y con eso alteraremos su comportamiento, pero no hemos logrado tener un acabado control de ninguna función celular de cierta complejidad. La célula sigue siendo una máquina cuyo funcionamiento sólo entendemos parcialmente. Sin embargo, el volumen de información que se incorpora diariamente a las bases de datos es apabullante y pareciera que en pocos años todo lo que se podría saber sobre la célula estará a nuestra disposición. Pero esta es una falsa impresión. Estamos muy lejos de entender cómo se coordinan todos los mecanismos celulares para dar una respuesta adecuada a cada situación que la célula debe afrontar. O sea, sabemos cuáles son los componentes de las células, tenemos bastante información sobre cómo se ensamblan la mayoría de estos componentes para dar las estructuras celulares, y entendemos con algún detalle cómo funcionan la mayoría de estas estructuras en forma aislada, pero no conocemos suficiente para entender los mecanismos de control y regulación que permiten que todos estos componentes y estructuras se coordinen para hacer que la célula funcione como una unidad que realiza las más diferentes y complejas tareas en forma eficiente. Pensemos que la célula es una máquina, un dispositivo complejo que trabaja automáticamente. Sin embargo da respuestas tan acertadas a los más complejos desafíos que parece que piensa y razona. Es interesante observar cómo los biólogos celulares y moleculares muchas veces hablan de la célula como si fuera un ser inteligente y no un mecanismo automatizado. No es extraño leer o escuchar oraciones como por ejemplo, "la célula luego de duplicar su DNA, lo revisa para ver si tiene muchos errores genéticos antes de decidir si entra en división celular o no". En realidad, dentro del ciclo celular que controla la división de las células hay mecanismos moleculares que disparan la duplicación del DNA y la presencia de errores en esa duplicación genera señales que bloquean el inicio de la división celular. O sea cada etapa tiene mecanismos de control que se autorregulan y que pueden ser influenciados por el medio, de tal modo la célula parece responder a las diferentes situaciones como un ser racional. En el fondo no entendemos cómo se logra el extraordinario nivel de regulación que le permite a esta maquinilla crecer, dividirse, atacar o defenderse o incluso morir en base a un plan que responde a sus intereses individuales o, en el caso de un organismo multicelular como el ser humano, a los intereses del individuo al cual pertenece.

Métodos automatizados de análisis y el surgimiento de la Biología de Sistemas

La regla para conocer el funcionamiento de una célula ha sido purificar, aislar y analizar los componentes y estructuras en condiciones experimentales simples y bien controladas. Sin embargo, a raíz de los modernos métodos analíticos de alto rendimiento, se ha generado un modo distinto de analizar las funciones celulares que no depende de aislar los componentes o las funciones sino por el contrario analizar conjuntos complejos de componentes y funciones. Esta modalidad para estudiar la célula como un todo, es decir tomando un punto de vista más holístico que el tradicional, es lo que hoy se denomina Biología de Sistemas (Systems Biology) y está en plena evolución.

Los métodos analíticos automatizados a los que nos referimos permiten hacer un barrido de todos o casi todos los elementos de una célula. El desarrollo de estos métodos estuvo grandemente potenciado por el tremendo desafío de secuenciar el genoma humano, lo que llevó a establecer tecnologías rápidas y confiables para esta difícil tarea. Mediante los mismos hemos podido no sólo conocer la secuencia de nuestro DNA sino también del DNA presente en un gran número de organismos desde bacterias a plantas e incluso en muestras complejas como una palada de tierra o un litro de agua de mar. La fabricación de microchips conteniendo decenas de miles de secuencias distintas de polinucleótidos dio lugar a poder identificar la totalidad de los RNAs producidos por una célula o conjunto de células en un momento dado, lo que se denomina un transcriptoma. El desarrollo de la espectrometría de masa ha permitido la identificación de grandes conjuntos de proteínas presentes en cualquier tipo de muestra, lo que ha llevado a la obtención de los proteomas. Usando técnicas similares se está trabajando en lograr los lipidomas o sea, el conjunto de lípidos presentes en una muestra. El éxito de estos métodos ha impulsado a desarrollar nuevas técnicas que combinan los resultados anteriores con novedosos sistemas de lectura para contestar preguntas a un nivel global. Por ejemplo, sabiendo la secuencia de todos los genes de un organismo, se pueden diseñar reactivos -como RNA de interferencia- que permiten silenciar de a uno por vez la expresión de cada gen en una célula, y ver el efecto que esto produce en alguna función que se pueda evaluar en forma automática.

Biología de Sistemas y Bioinformática

Una de las características generales de los métodos automatizados es que producen conjuntos enormes de resultados que sólo se pueden analizar haciendo uso intensivo de herramientas bioinformáticas para facilitar la organización y sistematización de la información. Es literalmente imposible poder analizar el resultado de estos estudios en forma manual. Por lo tanto, una de las características comunes a todos los estudios en esta área es el uso intensivo de herramientas matemáticas. En realidad, hay muchas otras áreas de la Biología que utilizan este tipo de técnicas. El conjunto de los métodos utilizados se denomina Bioinformática. El auge de la Biología de Sistemas con su uso intensivo de la Bioinformática ha hecho que estos dos campos se mezclen sin que hoy en día haya una separación clara entre los dos. Debido a esto, la Biología de Sistemas ha adquirido un significado más amplio que el análisis de las grandes bases de datos y que está más relacionado con un modo de aproximación a la Biología Celular y Molecular. Este modo, descrito en forma muy somera y laxa, consiste en tomar un conjunto generalmente grande de datos experimentales, que se ordenan y analizan utilizando un modelo computacional a partir del cual se pueden formular hipótesis que se pueden validar experimentalmente. Los nuevos datos se utilizan para refinar el modelo y así proponer nuevos experimentos y así siguiendo.

En realidad, la conjunción entre matemáticas y Biología Celular y Molecular tiene una larga y rica historia. Lo nuevo es que ahora esta combinación se está haciendo popular por lo que es de esperar que se logren importantes avances en los años próximos. La demanda creciente ha generado la necesidad de científicos trabajando en Bioinformática y Biología de Sistemas, por lo que se han creado departamentos y numerosas posiciones para llenar el vacío existente. Además, y dada la común ignorancia de los biólogos celulares en matemáticas, se han desarrollado numerosos programas, varios de ellos con interfaces para usuarios muy amigables de modo que pueden ser utilizados por cualquier científico interesado sin que necesite ser un experto en métodos matemáticos. Muchos de estos métodos utilizan una plataforma de lenguaje común (Systems Biology Markup Language, <http://www.sbml.org/index.psp>), de modo que son compatibles entre sí. Todavía más, muchos de estos programas son de uso libre para los científicos y se pueden bajar sin restricciones de Internet.

Desde redes metabólicas a parasitismo intracelular

Bajo el rótulo de Biología de Sistemas entonces caben una gran variedad de temas y métodos. Un modo estimulante de tomar contacto con el campo de la Bioinformática y la Biología de Sistemas es elegir una proteína cualquiera e ingresar su nombre en el portal Bioinformatic Harvester del Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Alemania (<http://harvester.fzk.de/harvester/>). El sitio realiza una búsqueda sobre toda la información disponible en las más variadas bases de datos sobre la molécula elegida, desde su secuencia, dominios, semejanzas con otras proteínas, a localización subcelular, integración en redes con otras proteínas y hasta los principales artículos científicos que describen la estructura y función de la proteína. Cada ventana con información, es en realidad un portal, donde se puede iniciar búsquedas en aspectos específicos de la proteína. Si uno está interesado en enzimas, el sitio Kinetikon (<http://kinetikon.molgen.mpg.de/>) que brinda una colección de las enzimas conocidas organizadas en redes metabólicas e información sobre las propiedades de las mismas.

Internet nos tiene acostumbrados al asombro en lo que se refiere a la obtención de información. Más novedoso es descubrir, como señalamos previamente, que la Biología de Sistemas ha generado una serie de herramientas que se encuentran disponibles en Internet en forma gratuita y que permiten diseñar una gran variedad de redes de interacción entre moléculas. Dado que la gran mayoría de las hipótesis en Biología Celular y Molecular se formulan en base a interacción entre moléculas, estas herramientas proveen un medio relativamente simple para dar un carácter más cuantitativo a las ideas que cada investigador tiene sobre el fenómeno que estudia.

A modo de ejemplo me voy a referir a dos procesos celulares que tuve la oportunidad de analizar utilizando una de estas herramientas. El primero era el análisis de la supervivencia de *Mycobacterium bovis* en macrófagos. Estas bacterias son capaces de sobrevivir por varios días dentro de macrófagos mediante mecanismos de resistencia a la capacidad bactericida de las células. La cepa vacunal BCG también resiste dentro de los macrófagos hasta una semana, pero finalmente muere. Los datos mostraban una cosa muy curiosa: las bacterias de la cepa BCG se encontraban todas en los compartimientos subcelulares denominados fagosomas tempranos, y muy pocas en los compartimientos degradativos denominados fagosomas tardíos (o fagolisosomas). Se especuló entonces que estas bacterias podrían morir y ser degradadas en fagosomas tempranos y no en fagolisosomas (Fig. 1). Sin embargo, la modelización del proceso utilizando el programa COPASI (Complex Pathway Simulator, <http://www.copasi.org/>) mostró que existían dos soluciones a lo observado: i) que todo ocurriera en fagosomas tempranos (Fig. 1, Modelo A), o ii) que hubiese un transporte lento a fagolisosomas y un rápido proceso de muerte y digestión en este compartimiento (Fig. 1, Modelo B). Finalmente esta segunda posibilidad resultó la correcta. En este caso la modelización ayudó a hacer más manejable un proceso que por lo complejo y por la diversidad de variables en juego era difícil de evaluar intuitivamente (1).

El segundo proceso estudiado fue la capacidad que tienen los fagosomas de nuclear actina para generar microfilamentos. Este fenómeno se puede reproducir en un tubo de ensayo y se ha observado que está modulado por varios lípidos y por ATP. El problema es que cuando uno agrega estas moléculas al sistema, las mismas son metabolizadas, de modo que no se sabe si su efecto en la polimerización de actina es directo o a través de algún metabolito que se genera en la membrana del fagosoma. Modelizamos una red de interconversión de lípidos y ATP en COPASI y la vinculamos con el proceso de polimerización de actina. Para determinar los parámetros de la red, se hicieron experimentos de curvas de tiempo analizando la estabilidad del ATP y la fosforilación de lípidos. La modelización mostró que la mayoría de los lípidos tienen un metabolismo lento y no cambiaban significativamente durante el ensayo de polimerización de actina; sin embargo los fosfoinosítidos y el ATP sí cambiaban durante el ensayo, de modo que para estimar su efecto sobre el ensayo era necesario tener en cuenta su comportamiento dinámico (manuscrito en preparación).

Perspectivas y conclusiones

El conocimiento en cualquier área de la ciencia se beneficia cuando surgen métodos nuevos. El auge de la Biología de Sistemas abre la posibilidad de dar a la Biología Celular y Molecular un cambio cualitativo. El hecho de aportar una visión holística, de conjunto, sin eludir la complejidad, sumado al apoyarse y promover el desarrollo de métodos analíticos automatizados de gran eficiencia y a utilizar herramientas poderosas de la Bioinformática, hace de esta rama de la Biología un campo fértil para entender la complejidad de los mecanismos regulatorios y de control que hacen funcionar a esta maravillosa máquina que es la célula.

Para finalizar, la Biología de Sistemas también ha generado controversias, muchas veces sobre bases bien fundadas. Una de las primeras reacciones adversas a este tipo de estudios surgió de los altos costos de los proyectos para recolectar los datos que luego se usan en la Biología de Sistemas. Pensemos en los millones de dólares que costó la secuenciación del genoma humano. Muchos científicos han señalado que estos estudios quitan financiación a estudios más focalizados que son planteados con mayor racionalidad. Otras críticas señalan que se utilizan modelos muy simplificados para representar la complejidad celular o que la elección del modelo es demasiado arbitraria. Sin embargo, con los avances logrados en los últimos años, está actualmente ampliamente aceptado en la comunidad científica la utilidad y riqueza de este nuevo enfoque. Queda claro que los distintos enfoques se deben complementar y que de la interacción de todos ellos surgirá una visión más completa de la complejidad celular.

Agradecimientos

Mi contacto con la Biología de Sistemas estuvo financiado por un Research Award de la Fundación Alexander von Humboldt que me permitió realizar una estadía en el European Molecular Biology

Laboratory (EMBL) en Heidelberg, Alemania. Agradezco además el apoyo del Dr. Gareth Griffiths donde realicé mi estadía y del Dr. Jens Reich que me introdujo en la Biología de Sistemas.

Reference List

1. Jordao, L., C. K. Bleck, L. Mayorga, G. Griffiths, and E. Anes. 2008. On the killing of mycobacteria by macrophages. *Cell Microbiol.* 10:529-548.

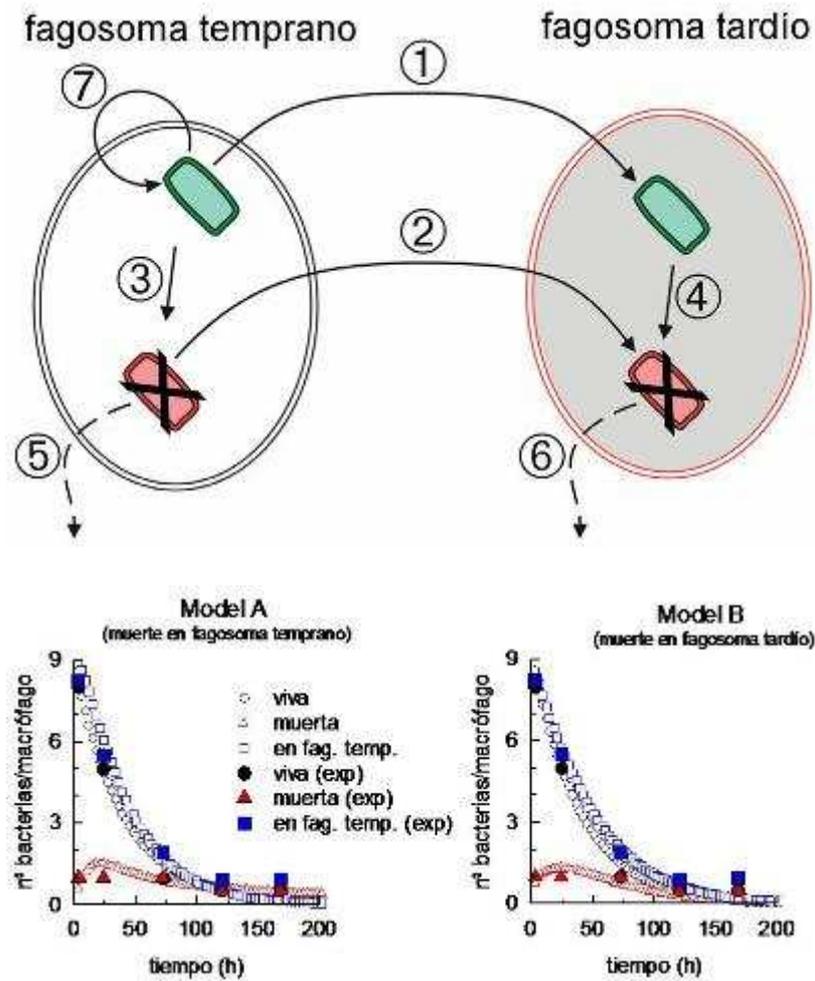


Figura 1. Panel superior. Etapas de transporte, muerte, degradación y duplicación en fagosomas tempranos y tardíos para la cepa BCG de *Mycobacterium bovis* en macrófagos. Estas siete etapas fueron modelizadas en el programa COPASI, que generó las ecuaciones diferenciales que describen el fenómeno. El mismo programa seleccionó el conjunto de parámetros de estas ecuaciones que mejor ajustaban los datos experimentales. En los paneles inferiores se grafican con símbolos grandes los datos experimentales representando el total de bacterias vivas, muertas y presentes en fagosomas tempranos a diferentes tiempo de infección. Con símbolos pequeños se muestran los valores predichos por el modelo. Curiosamente, COPASI encontró dos conjuntos de parámetros que ajustaban igualmente bien a los datos experimentales (Modelos A y B).