UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Análisis del efecto de la cafeína en un modelo computacional de neurona dopaminérgica, en relación a la enfermedad de Parkinson.

Diana Milena Gaitán Vaca

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería de Sistemas e Industrial

Bogotá, Colombia

2016

Análisis del efecto de la cafeína en un modelo computacional de neurona dopaminérgica, en relación a la enfermedad de Parkinson.

Diana Milena Gaitán Vaca

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Bioinformática

Director:

PhD. Andrés Mauricio Pinzón Velasco

Línea de Investigación: Biología de Sistemas

Grupo de Investigación: Bioinformática y Biología de Sistemas Computacional

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería de Sistemas e Industrial

Bogotá, Colombia

2016

Agradecimientos

Le agradezco al laboratorio de Bioinformática del Instituto de Genética de la Universidad Nacional, por abrir un cupo para desarrollar mi trabajo en ese lugar, así mismo a mis compañeros del grupo de investigación en Bioinformática y Biología de Sistemas por su inmensa colaboración y los consejos brindados.

A mi director de tesis Andrés Mauricio Pinzón Velasco por su dedicación y aporte de conocimientos y sin duda alguna por la confianza en mí para llevar a cabo este trabajo y lograr los resultados obtenidos.

A mis padres y hermana, por el apoyo incondicional siempre, por creer en mis capacidades, por guiarme y porque sin ellos la felicidad no sería completa.

A mi novio Anderson por ser una parte incondicional en mi vida, por quererme tanto, por acompañarme en este camino que elegimos y por ayudarme siempre para llegar hasta el final.

Y a todas aquellas personas que ayudaron en el camino para el desarrollo de esta investigación.

Resumen

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa de mayor importancia en el mundo después de la enfermedad de Alzheimer, afectando entre el 1% de los adultos mayores de 65 años y el 2% de los adultos mayores de 85 años. Numerosos estudios han encontrado una relación inversa entre el consumo de cafeína y el riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson, adicionalmente, se ha comprobado que la cafeína tiene la capacidad de proteger a las neuronas dopaminérgicas de la degeneración inducida por distintas neurotoxinas, mejorando su viabilidad. Con el fin de dilucidar los posibles mecanismos de neuroprotección mediados por la cafeína, se desarrolló un modelo computacional tejido específico, del conjunto de reacciones bioquímicas propias de la neurona dopaminérgica tomando como base el conjunto de reacciones de neurona que dan flujo a la función objetivo de mantenimiento celular, se añadieron los componentes de síntesis y transporte de dopamina, para la simulación de neurona saludable y neurona con Parkinson, utilizando como evidencia datos de expresión de genes, a partir de muestras postmortem de sustancia nigra en pacientes con Parkinson y controles. Se simularon 4 escenarios diferentes: neurona saludable, neurona saludable + cafeína, neurona Parkinson y neurona Parkinson + cafeína. Como resultado a estos cuatro escenarios se encontró que para el fenotipo metabólico de neurona saludable + cafeína hubo un aumento en el transporte de dopamina vía sodio (9,3 µM·h-1 a 37,6 µM·h-1), a comparación con el fenotipo encontrado en el modelo de neurona Parkinson + cafeína, donde los niveles de trasporte de dopamina vía sodio fueron constantes, pero mucho menores (-7,43 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -7,43 $\mu M \cdot h^{-1}$). Con respecto a los escenarios con cafeína negativa, utilizados como control en ambos escenarios, se hallaron valores de flujo de (10 $\mu M \cdot h^{-1}$) para el modelo saludable y de (-8 $\mu M \cdot h^{-1}$) para el modelo Parkinson. Por lo tanto, teniendo en cuenta estos resultados, se puede inferir principalmente que, la cafeína no muestra efectos negativos en el mantenimiento celular de la neurona, y por ende no hay ni muerte celular, ni deficiencia en su metabolismo, por lo que la neurona no se ve afectada de manera negativa con la presencia de esta sustancia.

Palabras clave

Parkinson, neurona dopaminérgica, cafeína, modelo computacional

Abstract

Parkinson's disease is the second most important neurodegenerative disease in the world after Alzheimer's disease, affecting between 1% of adults over 65 years and 2% of adults over 85 years. Numerous studies have found an inverse relationship between caffeine intake and the risk of developing Parkinson's disease; in addition, caffeine has been shown to have the ability to protect dopaminergic neurons from neurotoxin-induced degeneration, improving their viability. In order to elucidate the possible mechanisms of neuroprotection mediated by caffeine, a tissue-specific computational model was developed from the set of biochemical reactions typical of the dopaminergic neuron based on the set of neuronal reactions that give flux to the objective function of cellular maintenance, also, dopamine synthesis and transport reactions were added. For healthy neuron and Parkinson neuron simulation were used evidence of gene expression from postmortem substantia nigra samples in Parkinson patients and controls. Four different scenarios were simulated: healthy neuron, healthy neuron + caffeine, Parkinson's neuron and Parkinson's neuron + caffeine. As a result of these four scenarios it was found that for the metabolic phenotype of healthy neuron + caffeine there was an increase in the transport of dopamine via sodium (9.3 $\mu M \cdot h^{-1}$ to 37.6 $\mu M \cdot h^{-1}$), compared with the phenotype found in the Parkinson + caffeine simulation, where levels of dopamine transport via sodium were constant but much lower (-7.43 $\mu M \cdot h^{-1}$ to -7.43 $\mu M \cdot h^{-1}$). With regard to negative caffeine scenarios, used as controls, flux values of (10 $\mu M \cdot h^{-1}$) were found for the healthy model and (-8 $\mu M \cdot h^{-1}$) for the Parkinson model. Therefore, taking into account these results, it can be inferred mainly that, caffeine does not show negative effects on the cellular maintenance of the neuron, and therefore there is neither cell death nor deficiency in its metabolism, so the neuron Is not negatively affected by the presence of this substance.

Key words

Parkinson, dopaminergic neuron, caffeine, computational model

Contenido

Agradecimientos 5

Resumen 6

Abstract 7

Contenido 8

Lista de Tablas 10

Lista de Figuras 11

Introducción 13

1. Marco Teórico 15

1.1 Reconstrucciones Metabólicas a Escala Genómica (GSMN's) 15

1.1.1 Construcción de GSMN's 16

1.1.2 Reconstrucción automática 17

1.1.3 Reconstrucción manual 19

1.1.4 Uso y análisis de las GSMN's 22

1.2 Enfermedad de Parkinson 25

1.2.1 El metabolismo de la dopamina 26

1.2.2 Estrés oxidativo 28

1.3 Neuroprotección por agentes externos en la enfermedad de Parkinson 29

1.3.1 Nicotina 29

1.3.2 Antinflamatorios no esteroideos (AINE's) 30

1.3.3 Cafeína 31

1.3.3.1 Metabolismo de la cafeína 32

1.4 La cafeína como tratamiento sintomático en la enfermedad de Parkinson 34

1.5 La cafeína como tratamiento neuroprotector en la enfermedad de Parkinson 35

2. Objetivos 36

2.1 Objetivo general 36

2.2 Objetivos específicos 36

3. Metodología 37

3.1 Modelo computacional 37

3.2 Integración de metabolismo de cafeína 39

3.3 Evaluación del efecto metabólico de la cafeína 40

3.4 Identificación de mecanismos moleculares de neuroprotección 41

4. Resultados y discusión 42

4.1 Modelo computacional 42

4.1.1 Determinación de la distribución de flujos metabólicos 42

4.1.2 Rangos de flujos mínimos y máximos para las reacciones 44

4.2 Integración de metabolismo de cafeína 47

4.2.1 Determinación de la distribución de flujos metabólicos 47

4.2.2 Rangos de flujos mínimos y máximos para las reacciones 50
4.3 Efecto metabólico de la cafeína 52
4.3.1 Influencia de las reacciones sobre la función objetivo 58
4.4 Identificación de mecanismos moleculares de neuroprotección 60
5. Conclusiones 62
6. Recomendaciones 64
7. Anexos 65
8. Bibliografía 69

Lista de Tablas

Tabla 1. Componentes y reacciones introducidas al modelo computacional base de neurona dopaminérgica **……...37**

Tabla 2. Reacciones del metabolismo de cafeína integradas al modelo metabólico de neurona dopaminérgica en relación a la enfermedad de Parkinson**……..39**

Tabla 3. Lower Bound y Upper Bound de reacciones de importancia metabólica en el modelo de neurona saludable**…….....46**

Tabla 4. Lower Bound y Upper Bound de reacciones de importancia metabólica en el modelo de neurona Parkinson**……..47**

Tabla 5. Lower Bound y Upper Bound de reacciones de importancia metabólica en el modelo de neurona saludable + cafeína**……51**

Tabla 6. Lower Bound y Upper Bound de reacciones de importancia metabólica en el modelo de neurona Parkinson + cafeína**……52**

Lista de Figuras

Figura 1. Descripción general del procedimiento de reconstrucción iterativa de redes metabólicas. Tomado de Thiele & Palsson, (2010) **……..…..16**

Figura 2. Pasos principales involucrados en FBA. Tomado de (Raman & Chandra, 2009)**…….23**

Figura 3. Características y localización de la sustancia *nigra pars* compacta (SNpc)**……26**

Figura 4. Metabolismo y síntesis de dopamina Tomado de Moussa *et al.,* (2006)**……27**

Figura 5. Metabolismo de la cafeína en humanos reportado en KEGG**……33**

Figura 6. Diseño experimental para evaluar el efecto metabólico de la cafeína en el modelo computacional**……...……..……40**

Figura 7. Análisis de Balance de Flujo de los modelos saludable y Parkinson**……..….43**

Figura 8. Número de reacciones que participan de la solución en el modelo de neurona dopaminérgica para neurona saludable y neurona Parkinson**……44**

Figura 9. Análisis de Variabilidad de Flujo para los modelos saludable y Parkinson**…….45**

Figura 10. Análisis de Balance de Flujo para los modelos saludable + cafeína y Parkinson + cafeína**……..…….....48**

Figura 11. Número de reacciones que participan de la solución en el modelo de neurona dopaminérgica para neurona saludable + cafeína y neurona Parkinson + cafeína**…….49**

Figura 12. Análisis de Variabilidad de Flujo de los modelos saludable + cafeína y Parkinson + cafeína**……...50**

Figura 13. Cambios en reacciones de importancia metabólica en los modelos saludable y saludable + cafeína**……..…53**

Figura 14. Cambios en reacciones de importancia metabólica en los modelos Parkinson y Parkinson + cafeína**……54**

Figura 15. Variaciones de flujo en las reacciones de cafeína tanto para el modelo saludable + cafeína como para el modelo Parkinson + cafeína……..**56**

Figura 16. Cambios en reacciones de importancia metabólica en los modelos saludable y Parkinson + cafeína……**57**

Figura 17. Análisis de robustez entre la función objetivo de biomasa y cafeína…….……..…**58**

Figura 18. Análisis de robustez entre la entrada de tirosina extracelular y cafeína……...……..**59**

Introducción

En el año de 1958 se dio a conocer la relación inversa existente entre la enfermedad de Parkinson (EP) y agentes externos (Larumbe *et al.,* 1999), aumentando desde entonces los estudios de esta asociación y ampliando las investigaciones a otras sustancias de consumo regular como el café (Ross *et al.,* 2000), té (Ascherio *et al.,* 2001), alcohol (Benedetti *et al.,* 2000), entre otras. Estas investigaciones evidenciaron la existencia de una relación inversa entre estos agentes y la EP; años después y gracias al desarrollo de estudios retrospectivos epidemiológicos a gran escala (Ross *et al.,* 2000; Powers *et al.,* 2008) y metaanálisis (Sugita, 2001; Hernán, 2002), se estableció la existencia de una relación de neuroprotección y se describieron además las propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras del café en modelos murinos con EP (Lee *et al.,* 2013).

Con base en estos resultados, investigaciones posteriores se han centrado en identificar genes que aumenten o disminuyan el efecto protector de sustancias de uso común como la cafeína y la nicotina (Larumbe *et al.,* 1999; Ascherio *et al.,* 2001; Benedetti *et al.,* 2000; Chen *et al.,* 2005; Powers *et al.,* 2008) así como esclarecer cuales son los verdaderos mecanismos moleculares que están asociados con la enfermedad, con el objetivo de que esta información pueda ser usada no solo como método de prevención sino como fuente para posibles tratamientos.

Por otra parte, dado que la cafeína es la sustancia psicoestimulante más consumida en el mundo (Ferré, 2008ª; Mitchell *et al.,* 2014), aunque es un psicoestimulante, generalmente no se considera una droga típica de dependencia (Daly & Fredholm, 1998). Cerca del 90% de la población mundial consume con regularidad bebidas o alimentos que contienen cafeína. El consumo interno en países productores es uno de los motores del crecimiento de la demanda mundial, y en Colombia en particular este crecimiento ha sido muy dinámico, ya que se ha reportado que en los últimos cinco años el consumo interno de café ha incrementado un 33% (Federación de Cafeteros, 2016).

Con el fin de avanzar en el conocimiento de los posibles mecanismos neuroprotectores de la cafeína, que lleven a la identificación de posibles blancos terapéuticos y/o estrategias para el control de la enfermedad, este proyecto se ha desarrollado con el objetivo de generar un modelo computacional de tipo celular mayormente implicado con la EP, la neurona dopaminérgica, así como en simular los procesos fisiológicos asociados a ésta durante la EP y en generar y describir predicciones computacionales acerca de los

posibles mecanismos de neuroprotección frente a la enfermedad, mediados por el consumo de cafeína. El modelo de neurona dopaminérgica acá desarrollado, así como las simulaciones de enfermedad y neuroprotección acá descritos, se han ceñido de manera estricta a la información biológica más reciente y representa la simulación computacional más completa y cercana a la realidad biológica de una célula dopaminérgica en el contexto de la EP.

1. Marco Teórico

1.1 Reconstrucciones Metabólicas a Escala Genómica (GSMN's)

La reconstrucción de redes metabólicas a escala genómica (GSMNs) puede definirse como el proceso de recopilación y formalización matemática del conjunto de reacciones bioquímicas presentes en un organismo o tejido dado, y el cual es recuperado a partir de las enzimas codificadas en el genoma de un organismo. Un proceso de reconstrucción metabólica implica saber, para cada reacción presente en el organismo, cuales son los sustratos y productos, su estequiometria, la reversibilidad de la reacción y su localización (Feist *et al.,* 2009). En la actualidad, es una herramienta indispensable para el estudio del metabolismo desde un enfoque de biología de sistemas, que permite integrar diversos datos ómicos (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica), en búsqueda de un entendimiento holístico del sistema biológico bajo estudio. Esta metodología ha sido ampliamente utilizada en el análisis de, por ejemplo, las propiedades generales de las redes de metabolismo, demostrando que la magnitud de la variabilidad del flujo en las reacciones bioquímicas depende en gran medida de las condiciones ambientales y de la composición de la red (Mahadevan & Schilling, 2003). También ha permitido, la predicción y el análisis de fenotipos de crecimiento de distintos organismos, logrando importantes coincidencias con los datos experimentales, tales como la tasa máxima de utilización de oxígeno, la máxima tasa de utilización de glucosa aeróbica, la tasa máxima de utilización de glucosa anaeróbica, los requisitos de mantenimiento no relacionados con el crecimiento y los requisitos de mantenimiento asociados al crecimiento (Varma & Palsson, 1994), la interpretación de datos experimentales, utilizando modelos de reconstrucción a escala genómica de redes reguladoras metabólicas y transcripcionales de organismos de importancia (Barrett *et al.,* 2005). Es de destacar también la utilización de estos modelos en la ingeniería metabólica, que ha permitido el desarrollo de metodologías como OptStrain destinado a guiar modificaciones en las rutas metabólicas, a través de adiciones y deleciones de reacciones, de redes microbianas para la optimización en la producción de compuestos de interés (Pharkya *et al.,* 2004).

1.1.1 Construcción de GSMN's

El proceso de reconstrucción de metabolismo a escala genómica es actualmente un procedimiento generalizado, ampliamente probado por varios autores y el cual, si bien cuenta con ciertas posibilidades de innovación, se encuentra en términos generales estandarizado (Rocha, 2008; Thiele, 2010). En términos generales se requiere de 3 a 4 pasos fundamentales para la reconstrucción a escala genómica de modelos metabólicos (Thiele, 2010; Triana *et al.,* 2014) (Figura 1).

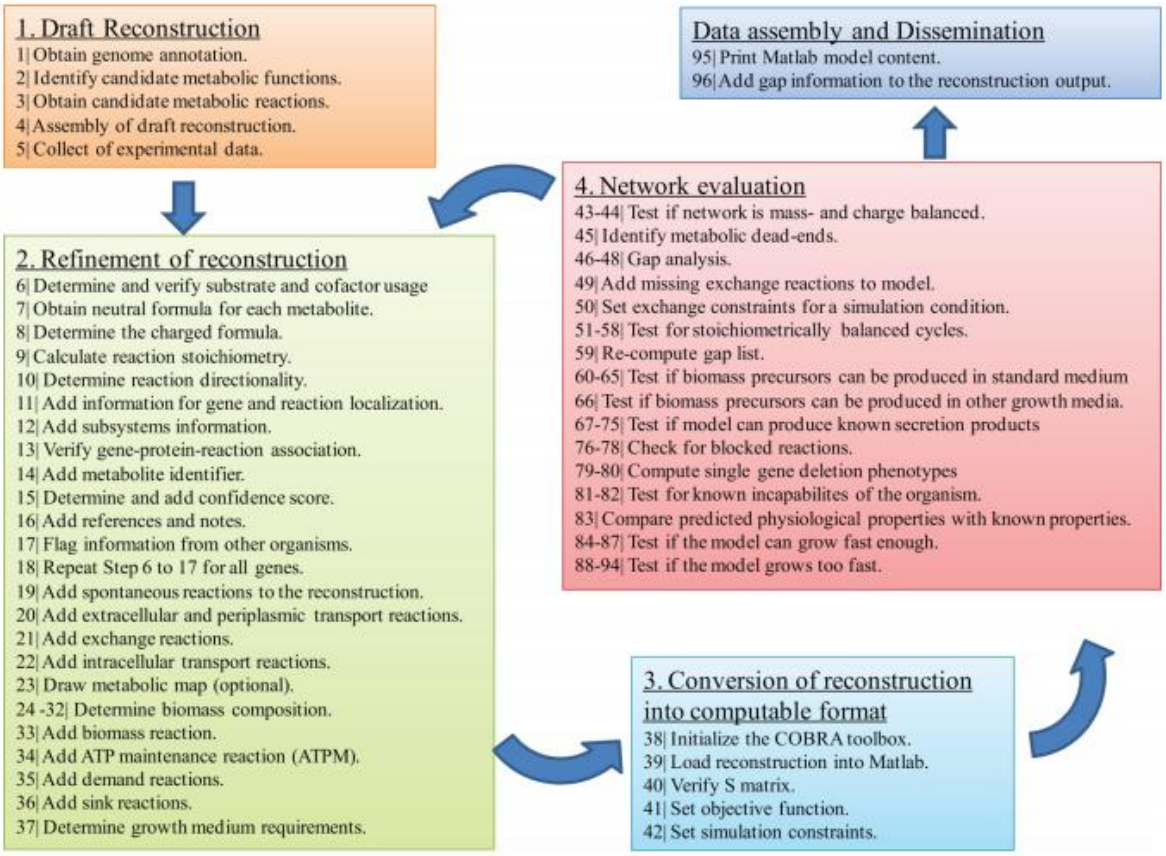


Figura 1. Descripción general del procedimiento de reconstrucción iterativa de redes metabólicas. Tomado de Thiele & Palsson, (2010). El procedimiento consta de cuatro pasos fundamentales. 1- Creación de una reconstrucción borrador, donde se define el sistema con la anotación del genoma y las reacciones del candidato metabólico. 2- Refinamiento de la reconstrucción, este es el paso más importante y de mayor demanda de tiempo en todo el proceso. Al ser un paso llevado a cabo casi de manera manual, es el paso de curaduría más importante de la reconstrucción, a grandes rasgos es en este paso donde se asegura que el conjunto de reacciones bioquímicas obtenidas es consistente, tanto en balance de masas, en su carga iónica, y en la conectividad de la red. Es también

en este paso donde se define e implementa la función objetivo del sistema. 3- Conversión de la reconstrucción en un formato computable, se establecen también las restricciones biológicas, generalmente con base en datos experimentales. 4- Evaluación de la red, este es un proceso iterativo en el que el modelo se evalúa constantemente y se retroalimenta con el paso anterior (ej. se identifican los dead-ends, los gaps y se optimiza el modelo), hasta lograr un modelo que refleje de la mejor manera la biología del sistema bajo estudio.

Este proceso pasa por generar un borrador del modelo metabólico del organismo en cuestión, seguido de un refinamiento exhaustivo, así como de una validación del mismo a través de las capacidades de la red metabólica. La curación iterativa del modelo que incluye el análisis de huecos en la red, así como el ajuste metabólico para su llenado, la eliminación de ciclos fútiles, entre otras, son parte crucial en el proceso de depurado. En este sentido, se han reportado varios métodos que inciden de manera significativa en el refinamiento de la red (Osterman, 2003; Green, 2004; Kharchenko *et al.,* 2004; Chen, 2006; Kharchenko *et al.,* 2006; Kumar *et al*., 2007).

De esta manera y de forma general, las reconstrucciones metabólicas a escala genómica pueden llevarse a cabo de dos maneras: automática o manual, aunque es posible incluir una tercera en la cual una combinación de estrategia manual y automática es utilizada. A continuación, se detalla cada una de estas dos estrategias.

1.1.2 Reconstrucción automática

El proceso de reconstrucción de una red metabólica a escala genómica de un organismo tiene un gran costo en cuanto a mano de obra se refiere. Se ha observado que el número de modelos metabólicos disponibles es menor al 1% de la de los genomas completamente secuenciados (Suthers *et al.,* 2009). Por lo tanto, existe una clara necesidad de acelerar y racionalizar el proceso de reconstrucción de este tipo de modelos.

En términos generales podemos definir una reconstrucción automática como el proceso de formalización matemática del conjunto de reacciones bioquímicas de un organismo o tejido, que se lleva a cabo sin ningún tipo de curaduría o intervención humana, es decir, que se crea a partir de la búsqueda y asociación de genes, proteínas y reacciones bioquímicas mediante minería de datos y procesos computacionales automatizados. Este tipo de reconstrucciones, a pesar de grandes avances en los algoritmos para su

generación, siguen siendo imprecisas, principalmente debido a limitaciones inherentes y errores contenidos en las bases de datos individuales consultadas para su creación (Ginsburg, 2009). Las fuentes comunes de problemas son la no singularidad de los identificadores de metabolitos (algunos compuestos están representados por clases genéricas tales como "alcohol"), especies atómicas desequilibradas que surgen de una estequiometría o fórmula incorrecta para uno o más reactivos, cofactores incorrectos o desaparecidos y enzimas que catalizan más de una reacción (Poolman *et al.,* 2006). Problemas adicionales son causados por la falta de uso de estándares para la anotación de metabolitos y reacciones, haciendo la comparación de diferentes modelos extremadamente difícil (Radrich *et al.,* 2010).

Algunos de los métodos y herramientas comúnmente utilizados para el desarrollo de reconstrucciones automáticas se describen a continuación.

Pathway Tools: es un entorno de software para la creación de una base de datos modelo-organismo (MOD), llamada como una base de datos pathway/genome (PGDB). Esta base de datos integra información acerca de genes, proteínas, redes metabólicas y redes genéticas de un organismo. Pathway Tools provee al usuario dos diferentes modalidades para interactuar con una PGDB: provee una interfaz gráfica que permite al usuario visualizar los contenidos de una PGDB y actualizar interactivamente una PGDB. Su módulo PathoLogic toma un genoma anotado para un organismo e infiere probables reacciones metabólicas y rutas para producir una nueva base de datos de ruta/genoma. Su componente MetaFlux puede generar un modelo metabólico cuantitativo para esa base de datos de ruta/genoma usando un análisis de balance de flujo. Su componente Navigator provee extensas herramientas de visualización y consulta, como la visualización de metabolitos, rutas y la red metabólica completa (Karp *et al.,* 2002).

Model SEED: es una herramienta utilizada para el análisis, comparación, reconstrucción y curación de modelos metabólicos a escala genómica (Henry *et al.,* 2010). Esta permite que los usuarios puedan subir las secuencias del genoma al sistema de anotación RAST, y la anotación resultante puede ser entubada automáticamente en el modelo SEED para producir un borrador del modelo metabólico. El modelo SEED construye automáticamente una red de reacciones metabólicas, asociaciones de reacciones gen-proteína para cada reacción, y la composición de la biomasa de cada genoma para producir un modelo del metabolismo microbiano que puede ser estimulado usando Análisis de Balance de Flujo (Overbeek *et al.,* 2004).

Merlin: es una aplicación Java de uso fácil que ayuda a la reconstrucción de modelos metabólicos de escala genómica para cualquier organismo que tenga su genoma secuenciado. Realiza los principales pasos del proceso de reconstrucción, incluyendo la anotación genómica funcional de todo el genoma y la posterior construcción de la cartera de reacciones. Además, incluye herramientas para la identificación y anotación de genes que codifican proteínas de transporte, generando las reacciones de transporte para esos portadores. También realiza la compartimentación del modelo, prediciendo la localización de organelos de las proteínas codificadas en el genoma y, por tanto, la localización de los metabolitos implicados en las reacciones promovidas por dichas enzimas. Las asociaciones gen-proteínas-reacciones (GPR) se generan automáticamente y se incluyen en el modelo. Por último, acelera la transición de datos genómicos a borradores de reconstrucciones de modelos metabólicos exportados en formato SBML estándar, permitiendo al usuario tener una visión preliminar de la red bioquímica, que puede ser curada manualmente en el entorno proporcionado por merlin (Dias *et al.,* 2015).

1.1.3 Reconstrucción manual

A la fecha todas las reconstrucciones metabólicas a escala genómica con amplia aplicabilidad en investigación y generación de hipótesis plausibles, han sido construidas ya bien, de manera semi-automática o manualmente, a través de un proceso de 4 pasos (Oberhardt *et al.,* 2008), la reconstrucción manual es de hecho también implementada en el modelo de reconstrucción semi-automático descrito anteriormente, pero en este caso desde el inicio de la reconstrucción el eje principal se encuentra en la intervención y curaduría humana. Su implementación más detallada es la siguiente: en primer lugar, se desarrolla una reconstrucción inicial a partir de datos de anotación de genes, junto con información de bases de datos en línea como KEGG (Kanehisa *et al.,* 2006) y EXPASY (Gasteiger *et al.,* 2003), que relacionan genes conocidos con categorías funcionales y ayudan a enlazar el gap genotipo-fenotipo. En segundo lugar, la reconstrucción inicial se realiza mediante revisión de literatura primaria. Luego, la reconstrucción como base de conocimientos se convierte en un modelo matemático que puede analizarse a través de enfoques basados en restricciones. En tercer lugar, la reconstrucción se válida mediante la comparación de las predicciones del modelo con datos fenotípicos. En un cuarto paso final, una reconstrucción metabólica se somete a ciclos continuos de laboratorio húmedo y seco, que mejoran la precisión y permiten investigar hipótesis clave (Oberhardt *et al.,* 2009). Generalmente, una reconstrucción incluye datos de anotación de genes semi-automatizada basada en las puntuaciones de homología tipo BLAST de un genoma

secuenciado, aumentado con datos detallados, recogidos manualmente de la literatura específica de organismos. Una de las contribuciones más inmediatas de las reconstrucciones metabólicas a escala genómica al conocimiento biológico, se encuentra en el proceso de análisis de la construcción del modelo, en el que las funciones genéticas no anotadas se incorporan al conocimiento de la anotación de genes mediante análisis de vías metabólicas incompletas pero esenciales (Chavali *et al.,* 2008; Gonzalez *et al.,* 2008; Oberhardt *et al.,* 2008). El proceso de análisis de gaps puede ser beneficioso tanto estimulando búsquedas bibliográficas que revelan datos fenotípicos previamente pasados por alto como planteando hipótesis para enzimas que probablemente existan en el organismo, pero para las cuales ningún gen correspondiente está actualmente anotado. Aparte de ofrecer hipótesis para futuros experimentos, este proceso sirve para cristalizar el trabajo realizado sobre un organismo particular y resaltar las áreas principales aún pendientes de investigación (Manichaikul *et al.,* 2009).

El mismo proceso puede, en teoría, ser aplicado para la reconstrucción de modelos metabólicos de eucariotas y procariotas (Thiele, 2010). Sin embargo, los modelos eucariotas son más exigentes debido al tamaño y complejidad de sus genomas, así como a su compartimentalización celular.

<u>Balance de masas:</u> El balance de masas, también llamado balance de materiales, es una aplicación de la ley de conservación de masas al análisis de sistemas físicos. Al contabilizar el material que entra y sale de un sistema, se pueden identificar flujos de masa que podrían haber sido desconocidos o difíciles de medir sin esta técnica. La ley de conservación exacta utilizada en el análisis del sistema depende del contexto del problema, pero todas giran en torno a la conservación de la masa, es decir, que la materia no puede desaparecer o crearse espontáneamente (Himmelblau & Riggs, 2012). De manera general en lo que se refiere a el balance de masas en reconstrucciones metabólicas se establece la masa que entra en un sistema debe, por conservación de masa, abandonar el sistema o acumularse dentro del sistema. Matemáticamente hablando el balance de masas para un sistema sin una reacción química es el siguiente:

$$Entrada = Salida + Acumulación$$

Estrictamente hablando, la ecuación anterior también se aplica a los sistemas con reacciones químicas si los términos de la ecuación del balance se toman para referirse a la masa total, es decir, la suma de todas las especies químicas del sistema. En ausencia

de una reacción química, la cantidad de cualquier especie química que fluye dentro y fuera del sistema será la misma. Esto da lugar a una ecuación para cada especie presente en el sistema. Sin embargo, si este no es el caso, entonces la ecuación del balance de masa debe ser modificada para permitir la generación o agotamiento (consumo) de cada especie química. Algunos utilizan un término en esta ecuación para dar cuenta de las reacciones químicas, que serán negativas para el consumo y positivas para la producción. Sin embargo, la forma convencional de esta ecuación se escribe para tener en cuenta tanto un término de generación positivo (es decir, producto de reacción) como un término de consumo negativo (los reactivos usados para producir los productos) (Himmelblau & Riggs, 2012).

Balance de cargas: es un proceso en el que a los metabolitos se les asigna la composición elemental y los estados de protonación correctos, adicionalmente, las reacciones también tienen un proceso de asignación de carga y de equilibrio elemental. Por lo general, el equilibrio de carga se basa en una representación de programación lineal que minimiza la diferencia en la suma de la carga de los reactivos y la suma de la carga sobre los productos (Kumar *et al.,* 2012). La carga eléctrica total también se conserva en una reacción bioquímica. Por ejemplo, para una reacción de superóxido dismutasa, se puede escribir una matriz de carga eléctrica en la que se muestran las cargas atómicas de los compuestos. La matriz de carga (E) es ortogonal a la matriz (S) y cuando se multiplican, el producto debe ser cero si S está equilibrada también para electrones (Palsson, 2003).

GPR: asociaciones gen-proteína-reacción. Dado que la creación de un este tipo de modelos está basado en la información genómica, es decir, que la manera en que se establece la presencia o ausencia de una reacción bioquímica está dada por la presencia o ausencia del gen que codifica para una función enzimática dada, es fundamental establecer la asociación existente entre los genes, las proteínas (enzimas) y la reacción en que estas últimas participan, a esta asociación la conocemos como asociaciones GPR. La anotación del genoma a menudo proporciona información sobre la asociación GPR, es decir, que indica la función que tiene cada gen. La verificación y refinamiento necesarios en esta etapa incluye determinar si la proteína funcional es un complejo enzimático heteromérico, si la enzima (complejo) puede llevar a cabo más de una reacción y si más de una proteína puede llevar a cabo la misma función (es decir, existen isoenzimas). Para el primer caso, la anotación del genoma a menudo tiene información refinada, por

ejemplo, "proteína X, subunidad catalítica", lo que indica que hay al menos una subunidad necesaria para la función del complejo de proteínas. A menudo, se requiere una base de datos más amplia y/o búsqueda bibliográfica. Además, la composición del complejo de la proteína puede diferir entre organismos. En el segundo caso, también puede identificarse a partir de bases de datos bioquímicos y/o bibliografía. La multitarea de las enzimas también puede diferir entre los organismos. Cabe señalar que los errores o asignaciones incorrectas en las asociaciones de GPR cambiarán los resultados de los estudios de supresión de genes *in silico*. Sin embargo, las discrepancias entre *in silico* e *in vivo* pueden usarse para refinar el conocimiento y las reconstrucciones (Thiele & Palsson, 2010).

1.1.4 Uso y análisis de las GSMN's

Estos modelos actualmente son usados para predecir, *in silico*, la respuesta a las perturbaciones de los microorganismos, y para identificar dianas de fármacos candidatos (Rocha, 2008). Las reconstrucciones y su correspondiente modelo permiten la formulación de hipótesis acerca de la presencia de ciertas actividades enzimáticas y la producción de metabolitos que pueden ser probadas de manera experimental, complementando la aplicación del enfoque basado principalmente en el descubrimiento de la bioquímica microbiana tradicional con la investigación basada en hipótesis (Ivanova & Lykidis, 2009)

Con vistas a realizar análisis de los modelos metabólicos, están disponibles una variedad de herramientas y algoritmos (Patil *et al.,* 2004), incluyendo el análisis del balance de flujo (FBA, del inglés, Flux Balance Analysis) (Varma, 1993; Edwards *et al.,* 1999), minimización de los ajustes metabólicos (MOMA, del inglés Minimization of Metabolic Adjustments) (Segre *et al.,* 2002), el análisis del flujo metabólico (MFA, del inglés Metabolic Flux Analysis) (Varma, 1994; Schilling *et al.,* 1999).

<u>Análisis de Balance de Flujo:</u> es un enfoque matemático para analizar el flujo de metabolitos a través de una red metabólica (Oberhardt *et al.,* 2009). Dado que estas reconstrucciones contienen todas las reacciones metabólicas conocidas en un organismo y los genes que codifican cada enzima, el FBA calcula el flujo de metabolitos a través de la red, lo que hace posible predecir la tasa de crecimiento de un organismo o la tasa de producción de un metabolito biotecnológicamente importante (Orth *et al.,* 2010). Utiliza un enfoque de optimización lineal para determinar la distribución de flujo de las reacciones en estado estacionario en una red, mediante la maximización de una función objetivo. Una vez que la función objetivo se encuentra fijada, el sistema de ecuaciones puede

resolverse para obtener una distribución del flujo, y utilizarla para interpretar las capacidades metabólicas del sistema (Raman & Chandra, 2009).

El FBA está basado en el principio de conservación de masa en una red, la cual utiliza una matriz estequiométrica y una función objetivo relevante en el sistema para identificar las distribuciones óptimas del flujo de las reacciones (Raman & Chandra, 2009).

Con este fin se define una matriz estequiométrica S, de dimensión m × n con m metabolitos y n reacciones y c es el vector que representa la función objetivo lineal. Las variables de decisión v representan los flujos, con $V \subseteq \mathbb{R}^n$ y los vectores v_l y v_u especifican límites inferiores y superiores, respectivamente. Las restricciones Sv = 0 junto con los límites superior e inferior especifican la región factible del problema (Figura 2) (Gudmundsson & Thiele, 2010).

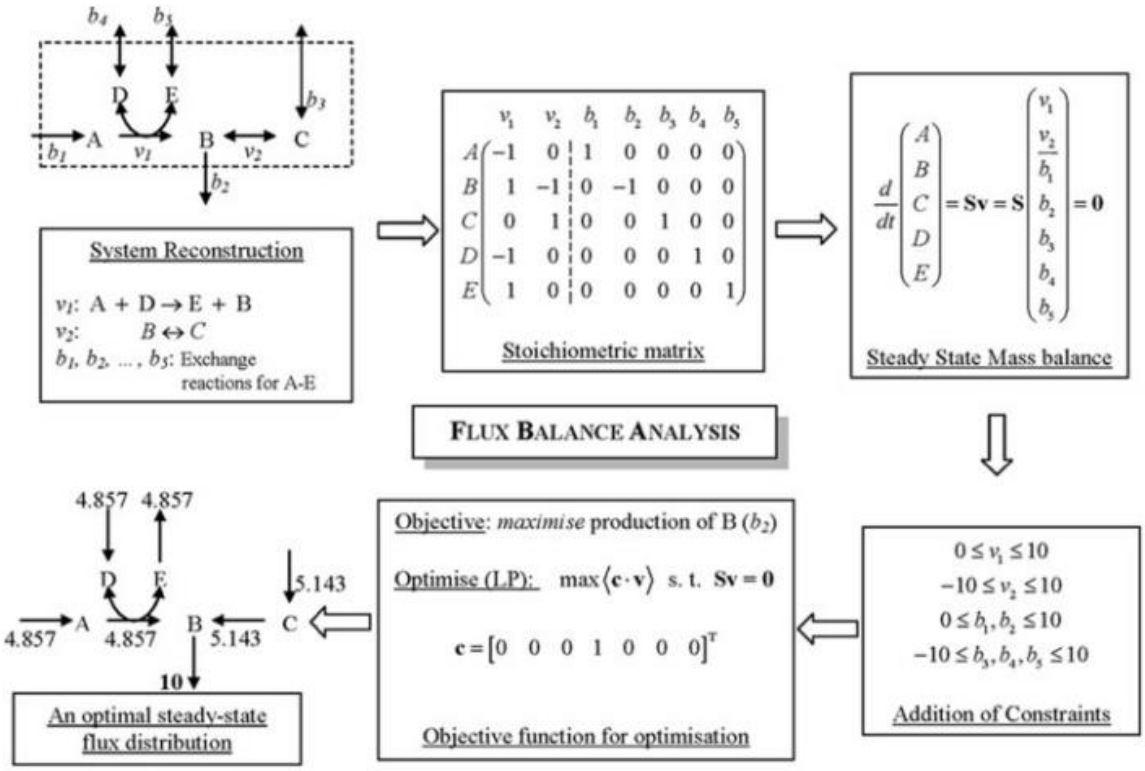


Figura 2. Pasos principales involucrados en FBA. Tomado de (Raman & Chandra, 2009). En general son necesarios cuatro pasos para llevar a cabo un Análisis de Balance de Flujo. 1- Definición del sistema, se definen las reacciones del modelo en términos de metabolitos involucrados, los genes y las correspondientes enzimas involucradas, así como los compartimentos y la reversibilidad de las reacciones. 2- Obtención de la matriz

estequiométrica de las reacciones con los flujos internos (v) y los flujos de intercambio (b). 3- Balance de masas en estado estacionario, donde la masa que entra en un sistema debe, salir o acumularse dentro del sistema. 4- Adición de restricciones, 5- Definición de la función objetivo para la optimización de la red, 6- Obtención de distribución de flujo óptimo en estado estacionario.

Análisis de Variabilidad de Flujo: el FBA nos permite conocer únicamente un único valor de flujo, de un rango posible de flujos, para cada una de las reacciones que participan en la solución del sistema, que permite obtener la misma solución óptima. El FVA se utiliza para establecer dicho rango, es decir, el flujo mínimo y máximo para las reacciones que participan de la solución en la red mientras se mantiene un cierto estado, este análisis identifica la distribución de flujos a través de las reacciones de una solución óptima de FBA, y para esto el Upper bound y Lower bound de la función objetivo se constriñe al valor dado por el FBA. después cada una de las reacciones de la solución se convierte en función objetivo y se calcula el flujo a través de cada una de ellas. Se obtiene así, para cada una de las reacciones, el valor máximo y mínimo de flujo. El FVA se ha utilizado por ejemplo para el establecimiento de las distribuciones de flujo bajo el crecimiento sub-óptimo, es decir, bajo estados en los que los organismos se devuelven por debajo de los límites de su máxima capacidad de actuación (Reed & Palsson, 2004), en el establecimiento de la flexibilidad y redundancia de la red (Thiele *et al.,* 2010), en la optimización de procesos de formulación de alimentos para la producción de antibióticos (Bushell *et al.,* 2006), y procedimientos óptimos de diseño de cepas (Pharkya & Maranas, 2006; Feist *et al.,* 2009).

Análisis de Robustez: la robustez es una propiedad inherente todos los sistemas que se comportan a nivel de red, como de las redes metabólicas, y que permite a los sistemas vivos mantener sus funciones celulares en respuesta a perturbaciones genéticas y ambientales (Kim *et al.,* 2007). Esta propiedad permite establecer que tan sensible es la función objetivo a cambios en otra reacción de la red (Rosenberg & Stephens, 2007). El estudio de la robustez metabólica en respuesta a las perturbaciones genéticas suele estar asociado con los conceptos de esencialidad genética y letalidad, aludiendo a si un organismo puede sobrevivir a deleciones de genes únicos o múltiples. Los genes esenciales consisten en genes cuya deleción individual es letal bajo una condición ambiental específica. Por analogía, los letales sintéticos (SL) se refieren a pares de genes no esenciales cuya deleción simultánea es letal (Novick *et al.,* 1989; Guarente, 1993).

1.2 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa de mayor importancia en el mundo después de la enfermedad de Alzheimer, se caracteriza por la presencia de temblor en reposo, bradicinesia o hipocinesia y rigidez muscular (Wirdefeldt *et al.,* 2011). Suele comenzar en las etapas medias o avanzadas de la vida y conduce con el tiempo a una incapacidad motora y cognitiva progresiva (Morris, 2000; Burch & Sheerin, 2005). Afecta a todos los grupos étnicos y presenta una prevalencia del 1% en la población mayor de 65 años, y del 2% en las personas de 85 años o más (Micheli, 1996; Chouza *et al.,* 2001; De Lau *et al.,* 2004). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la EP afecta aproximadamente a 6.3 millones de personas en todo el mundo (Infante *et al.,* 2014).

La característica patológica de esta enfermedad es la pérdida característica de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra pars* compacta (SNpc) (Figura 3). Mientras que la población normal tiene una pérdida de alrededor del 4.4% de las células en la sustancia nigra, los pacientes con EP tienen una pérdida 10 veces mayor (Hernández, 2006); hay que anotar que los síntomas no se desarrollan hasta que el 50-60% de las neuronas de la sustancia nigra se pierden y cerca del 80-85% del contenido de dopamina en el cuerpo estriado se agota (García, 2008; Wirdefeldt *et al.,* 2011).

Con base en análisis de los antecedentes familiares es posible clasificar a la EP en esporádica y familiar (Pankratz, 2007). Entre el 10% y el 25% de los casos presentan un patrón de herencia familiar determinado, ya sea dominante o recesivo. El resto de los casos, en donde no se puede identificar una mutación o que no presenta un patrón de herencia específico, se consideran esporádicos. Se han identificado mutaciones y polimorfismos en más de 10 genes relacionados con la EP ya sea como causales o genes de susceptibilidad para la enfermedad (Vidrio, 2007). Seis de estos genes (PARK1, PARK2, PARK5, PARK6, PARK7 y PARK8) han sido fuertemente implicados como causales o como factores de susceptibilidad para EP (Pankratz, 2007; López *et al.,* 2007; Vidrio, 2007).

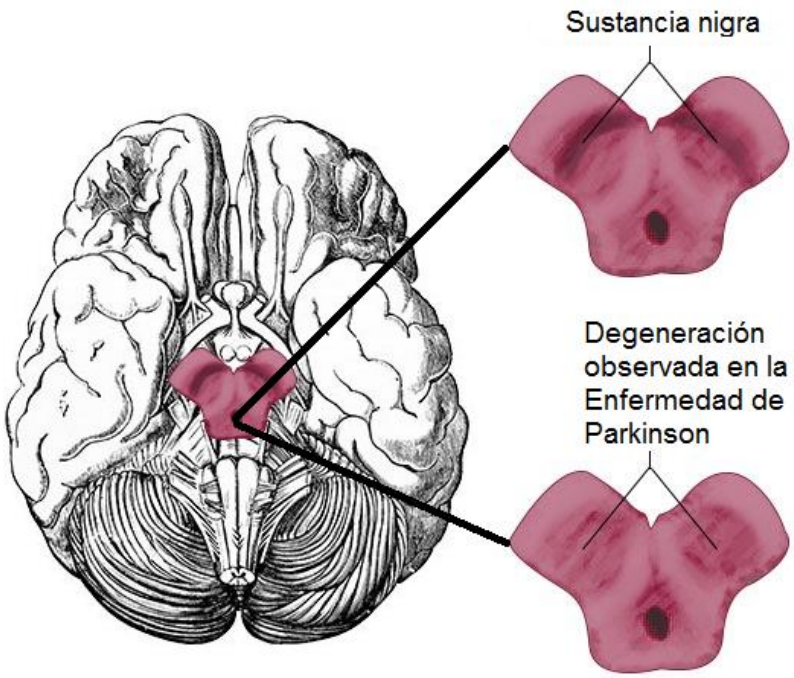


Figura 3. Características y localización de la sustancia *nigra pars* compacta (SNpc). La característica patológica de esta enfermedad es la pérdida característica de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (SNpc). La sustancia nigra está ubicada en la parte media del cerebro y está compuesta por una parte compacta y una reticulada. La parte compacta contiene neuronas que se tiñen de negro con un pigmento llamado neuromelanina, el cual incrementa con la edad. La degeneración de las neuronas pigmentadas en esta región es la principal patología que señala la enfermedad de Parkinson.

En los pacientes que carecen de una clara carga genética los mecanismos patogénicos son difíciles de entender, debido a la variedad de factores que participan, entre los que están tóxinas ambientales, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Sherer, 2001). Sin embargo, la ruta final común de los mecanismos patógenos que deterioran a las neuronas de la sustancia nigra es la muerte neuronal, proceso en el que participa de manera importante el estrés oxidativo dependiente de la dopamina.

1.2.1 El metabolismo de la dopamina

En condiciones de pH normal, las neuronas dopaminérgicas se exponen a estrés oxidativo por el metabolismo propio de la dopamina, que produce varias moléculas que

actúan como neurotoxinas endógenas tales como: la dopamina-quinona, los radicales superóxido, y el peróxido de hidrógeno (Graham, 1978). Alternativamente, la dopamina puede desaminarse por la enzima monoamino oxidasa A (MAOA) produciendo ácido 3,4-hidroxifenilacetico (DOPAC) y peróxido de hidrógeno (Maker *et al.,* 1981) (Figura 4). El superóxido no es una molécula altamente reactiva, pero al convertirse en peróxido de hidrógeno por acción de la superóxido dismutasa (SOD), o en radicales peroxinitritos lábiles en presencia de óxido nítrico, se vuelve altamente reactivo.

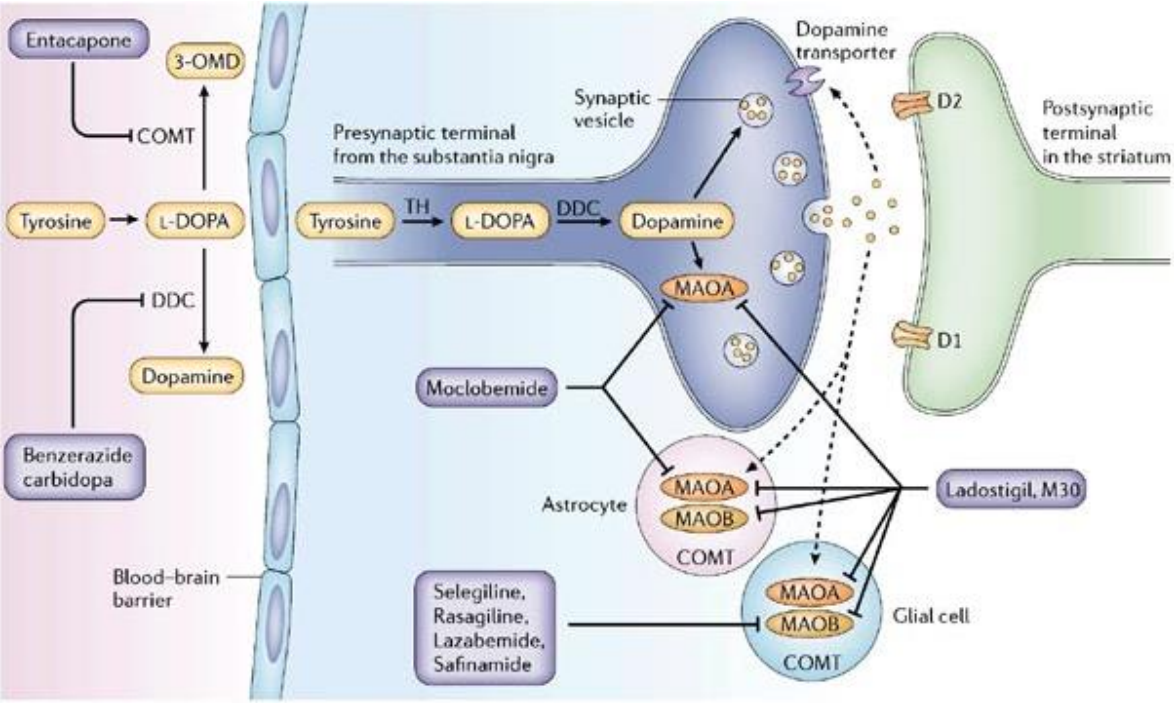


Figura 4. Metabolismo y síntesis de dopamina Tomado de Moussa *et al.,* (2006). La vía de la síntesis de dopamina procede de la tirosina a través de la catálisis de tirosina hidroxilasa (TH) a levodopa (L-DOPA) y posterior descarboxilación por dopa descarboxilasa (DDC) a dopamina. La dopamina es metabolizada por la monoaminooxidasa intraneuronal A (MAOA), y por la glia y astrocitos MAOA y MAOB. Aunque la dopamina no pasa la barrera hematoencefálica (BBB), la L-DOPA puede, y los inhibidores de la DDC que no pasan la BBB, como la benzerazida y la carbidopa, aumentan su disponibilidad al cerebro. Los inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT), como la entacapona, también aumentan la disponibilidad de L-DOPA y previenen la inactivación de la dopamina por la COMT. 3 - OMD, 3-O-metil-dopa; D1, D2, receptores de dopamina.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es relativamente inocuo, pero por una reacción catalizada por hierro (Fe_2^+) se producen radicales hidroxilos altamente citotóxicos. Cabe mencionar que en la sustancia nigra la concentración de Fe_2^+ siempre es más alta que en otras regiones del cerebro, lo que puede facilitar el desarrollo y establecimiento de la EP si la reacción entre el H_2O_2 y el Fe_2^+ estuviese aumentada. Las especies reactivas de oxígeno generadas por metabolismo de la dopamina originan alteraciones en las funciones de las proteínas y de algunos lípidos de la neurona. Una consecuencia inmediata del daño en los lípidos es la pérdida de la integridad membranal, lo que modifica la permeabilidad iónica, lo cual puede perturbar las propiedades eléctricas de la membrana, facilitando la toxicidad (Halliwell, 1992). Por todo lo anteriormente expuesto es imperativo que la dopamina sea inocua para la neurona, y esto se logra almacenándola rápidamente dentro de vesículas sinápticas, donde gracias al pH bajo y ausencia de la MAO, se tienen las condiciones adecuadas para mantener estable a la dopamina. El secuestro de dopamina por las vesículas sinápticas es el principal mecanismo por el cual las neuronas de la substancia nigra se protegen de los efectos dañinos de su oxidación (Gómez *et al.,* 2012).

1.2.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una condición dañina para las neuronas dopaminérgicas, y resulta de la eliminación deficiente de las especies reactivas de oxígeno que se generan por las reacciones relacionadas con la dopamina. Normalmente las especies reactivas son eliminadas por sistemas antioxidantes intracelulares, sin embargo, como resultado del proceso normal de envejecimiento, o por alguna alteración patológica, estos mecanismos no son funcionales (Gómez *et al.,* 2012). En la enfermedad de Parkinson las células de la sustancia nigra parecen estar en un elevado estado de estrés oxidativo, lo que se deduce por el aumento en productos de la oxidación de lípidos, proteínas y DNA; sin embargo, es posible que este aumento sea compensado por el incremento en la actividad de los sistemas antioxidantes (Sofic, 1988; Dexter, 1989; Saggu, 1989; Floor & Wetzel, 1998; Jenner, 1998).

1.3 Neuroprotección por agentes externos en la enfermedad de Parkinson

La levodopa es el estándar de referencia en la medicación contra el Parkinson, con efectos antiparkinsonianos más amplios que cualquier otro tratamiento. En el cerebro, las neuronas típicamente convierten la levodopa en dopamina. La levodopa funciona reemplazando la dopamina perdida por el Parkinson. La combinación de carbidopa y levodopa es la medicación más potente y efectiva contra el Parkinson y es utilizada para prevenir las náuseas y asegurarse de que la levodopa no sea metabolizada antes de entrar al cerebro (Fahn, 2005). Esta terapia, sin embargo, presenta efectos secundarios y su eficacia disminuye con la progresión de la enfermedad (Samii *et al.,* 2004; Lang & Obeso, 2004; Savitt *et al.,* 2006; Hodaje *et al.,* 2007; Singh *et al.,* 2007; Quick *et al.,* 2008). En las etapas iniciales del Parkinson, los efectos secundarios incluyen una baja en la presión arterial, náuseas, resequedad bucal y mareos. A medida que la EP avanza, pueden desarrollarse efectos secundarios motores tales como la distonía y la discinesia. Confusión y alucinaciones son efectos secundarios en la EP avanzada, pero menos prevalentes que las alucinaciones causadas por agonistas de dopamina. Dadas las implicaciones y efectos colaterales de la administración de estos medicamentos, existe una búsqueda permanente de estrategias alternativas para el tratamiento de esta enfermedad (Parkinson's Disease Foundation, 2012), en este sentido, al menos desde los años 90 se ha identificado algunos agentes externos significativamente relacionados con neuroprotección en EP.

1.3.1 Nicotina

Una de las observaciones más fuertes y más consistentes en los estudios epidemiológicos de la EP es la asociación inversa con el tabaquismo. Esta relación se observó por primera vez hace más de 40 años en estudios de mortalidad, que confirmaban que el riesgo de muerte por EP era menor en los fumadores que en los no fumadores, ya que se ha demostrado que hay aproximadamente dos veces menos EP entre los fumadores en comparación con los no fumadores (Dorn, 1959; Thiriez *et al.,* 2011).

Estudios *in vitro* y en animales han comprobado que la nicotina o los agonistas de los receptores nicotínicos pueden ser utilizados en el tratamiento terapéutico de EP, ya que se ha reportado que los agonistas nicotínicos tienen un papel importante en la neuroprotección contra el daño nigroestriatal y en la reducción de los efectos secundarios (discinesias) asociado con el tratamiento con L-dopa (Quik *et al.,* 2008).

Adicionalmente, existe una superposición extensa entre el sistema estriado nicotínico y dopaminérgico, que los receptores nicotínicos se expresan en estriado con varios subtipos presentes en terminales dopaminérgicos estriados, y que la activación del receptor nicotínico provoca la liberación de dopamina. Además, el tratamiento con nicotina mejora la expresión de algunos subtipos de receptores nicotínicos disminuyendo el daño nigroestriatal (Gentry & Lukas, 2002). Incluso recientemente se ha demostrado que la nicotina y la hidroquinona inhiben la agregación de α-sinucleína (Hong *et al.,* 2009). Por lo tanto, los datos experimentales indican que la administración crónica de nicotina tiene un efecto motor - sobre todo en las discinesias - y un efecto neuroprotector en los modelos de EP (Thiriez *et al.,* 2011).

1.3.2 Antinflamatorios no esteroideos (AINE's)

Son un grupo de fármacos con funciones principalmente antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, por lo que reducen la inflamación, el dolor y la fiebre respectivamente (Rivera, 2006). Se han reportado mecanismos neuroinflamatorios que pueden estar involucrados en EP (Hunot & Hirsch, 2003; Hirsch & Hunot, 2009).

Dentro de estos fármacos antiinflamatorios se encuentran la aspirina, ácido salicílico, ibuprofeno y celecoxib (Mohanakumar *et al.,* 2000; Di Matteo *et al.,* 2006). La aspirina juega un papel importante en el proceso de neuroinflamación y de degeneración neuronal (Starke *et al.,* 2015), adicionalmente, promueve la resolución de procesos inflamatorios (Claria & Serhan, 1995). El ácido salicílico es un metabolito producto de la aspirina, el cual es ampliamente utilizado para el tratamiento de infarto de miocardio y enfermedades cardiovasculares (Mohanakumar *et al.,* 2000).

Se ha reportado que los AINE's parecen reducir el riesgo a desarrollar EP, particularmente el ibuprofeno (Rees *et al.,* 2011). Mientras que los estudios de modelos animales de EP apoyan esta hipótesis (Teismann & Ferger, 2001), la literatura

epidemiológica sobre el efecto del uso de fármacos antiinflamatorios en la PD es mixta. Varios estudios sugieren un efecto protector de los fármacos antiinflamatorios sobre la EP en los seres humanos (Chen *et al.,* 2003; Chen *et al.,* 2005), mientras que otros no corroboran estos hallazgos (Hernán *et l.,* 2006; Ton *et al.,* 2006; Gagne & Power, 2010). Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar qué fármacos individuales funcionan mejor, qué dosis tomar y en qué período, que tipos de personas (personas con alto riesgo de EP o la población en general). Estos estudios también ayudarán a identificar posibles fármacos en pacientes con EP, para ver si podrían detener la progresión de la enfermedad o mejorar los síntomas (Rees *et al.,* 2011).

1.3.3 Cafeína

En el año 1820 fue aislada la cafeína, pero en la última década del siglo XIX la estructura correcta de esta metilxantina quedó establecida. Los efectos de esta sustancia no fueron claramente reconocidos hasta el año 1981, cuando el bloqueo de los receptores de adenosina se correlacionó con las propiedades estimulantes de la cafeína y de sus análogos (Daly, 2007). Probablemente la cafeína sea una de las sustancias psicoactivas más utilizadas en el mundo, generando efectos en innumerables funciones fisiológicas, incluyendo la resistencia física, el humor, el sueño y el dolor (Fredholm *et al*., 1999). Además de ser consumida como bebida (café y otras bebidas que contienen cafeína) diversos medicamentos analgésicos principalmente para la cefalea, contienen cafeína asociada con el paracetamol o con los antiinflamatorios no hormonales (Goldstein *et al.,* 2006).

La cafeína es un alcaloide que está presente en más de 60 especies de plantas (Sawynok, 2011). Su estructura molecular pertenece a un grupo de xantinas trimetiladas con sus compuestos íntimamente relacionados: teobromina (presente en el cacao) y la teofilina (presente en el té) (Daly, 2007). Químicamente, esos alcaloides se parecen a las purinas, xantinas y al ácido úrico, que son compuestos metabólicamente importantes (Sawynok, 2011). La cafeína produce los mismos efectos conductuales que los psicoestimulantes clásicos, es decir, activación motriz, despertar (arousal) y efectos reforzadores (Fredholm *et al*., 1999; Griffiths, 2003; Ferré, 2008). Además, produce en el ser humano efectos subjetivos que son cualitativamente similares a los de los psicoestimulantes clásicos (Griffiths, 2003)

El sistema dopaminérgico central es la diana principal de los efectos farmacológicos de los psicoestimulantes. Los cuerpos de las neuronas de las vías dopaminérgicas centrales están localizados en el mesencéfalo (en la sustancia nigra y el área tegmental ventral) y sus ramificaciones axónicas inervan una gran parte del cerebro (Gerfen, 2004). El estriado, la estructura de entrada de los ganglios basales, es el área cerebral que contiene la mayor inervación dopaminérgica y la mayor densidad de receptores dopaminérgicos (Gerfen, 2004). De acuerdo con su mecanismo de acción principal, los psicoestimulantes suelen clasificarse en bloqueadores de la recaptación de dopamina y liberadores de dopamina. Los bloqueadores de la recaptación, como la cocaína, se unen al transportador de dopamina e inhiben su función (Torres, 2003; Elliot, 2005). Los liberadores de dopamina, como la anfetamina, también se unen al transportador de dopamina, pero aumentan la liberación de ésta al revertir su transporte (Elliot, 2005; Sulzer *et al*., 2005). El efecto final común de los 2 tipos principales de psicoestimulantes es el aumento significativo de la dopamina en el espacio extracelular. De este modo, clásicamente los psicoestimulantes se han considerado agonistas indirectos de los receptores dopaminérgicos, para diferenciarlos de los agonistas directos, que se unen a los receptores dopaminérgicos y los estimulan directamente.

1.3.3.1 Metabolismo de la cafeína

La cafeína tiene una vida media de 4 a 5 horas, que puede prolongarse en pacientes con enfermedades hepáticas, lactantes y neonatos (hasta 100 h), o durante el embarazo (Begas *et al.,* 2007; Thorn *et al.,* 2012). La cafeína se metaboliza casi completamente y alrededor del 3% es excretada sin cambios en la orina (Begas *et al.,* 2007; Kot & Daniel, 2008). La principal vía de metabolismo en seres humanos es a través de la N-3 demetilación a paraxantina también conocida como 1,7-dimetilxantina o 17X (Benowitz *et al.,* 1995; Begas *et al.,* 2007; Kot & Daniel, 2008). Esta reacción es llevada a cabo por CYP1A2 en el hígado (Begas et al., 2007). Los experimentos con microsomas hepáticos humanos estiman que 1-N-desmetilación a la teobromina representa aproximadamente 7 a 8% del metabolismo de la cafeína con 7-N-desmetilación a la teofilina también alrededor del 7 al 8% (Kot & Daniel, 2008). El 15% restante de la cafeína sufre un proceso de hidroxilación C-8 para formar ácido 1,3,7-trimetilúrico (Kot & Daniel, 2008).

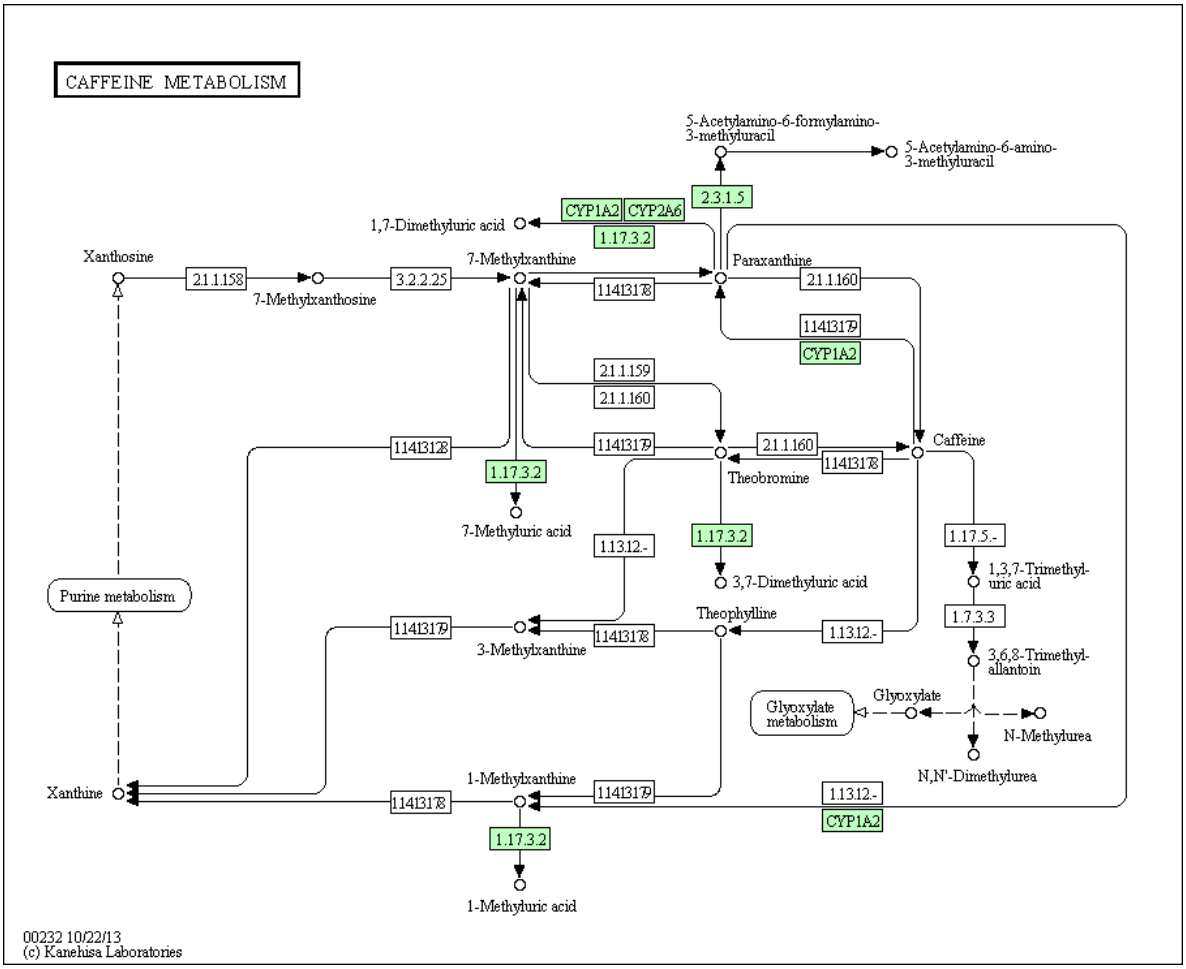


Figura 5. Metabolismo de la cafeína en humanos reportado en KEGG. La cafeína es metabolizada en el hígado por la isoenzima del citocromo P-450 (CYP), por demetilación, transformándola en paraxantina (85%), teobromina (10%) y teofilina (5%), excretándose solo el 3% como cafeína inalterada por la orina. La cafeína puede sufrir las siguientes transformaciones metabólicas: 1- demetilación inicial para dar origen a dimetilxantinas como teofilina, teobromina y paraxantina. 2- oxidación para generar el ácido 1,3,7-trimetilúrico y 3- hidratación y ruptura del anillo para producir dimetiluracilo.

CYP1A2 es responsable de más del 95% del metabolismo primario de la cafeína (Kalow & Tang, 1993). Por lo tanto, la cafeína es usada como una droga de prueba para la actividad de CYP1A2, con un radio relativo de metabolitos urinarios usados como un indicador de flujos a través de diferentes partes de la red (Begas *et al.,* 2007). Además de la paraxantina, los principales metabolitos de la cafeína en la orina son 1-metilxantina (1X), ácido 1-metilúrico (1U), 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo (AFMU), ácido 1,7-dimetilurico 17U) (Begas *et al.,* 2007). Estos se forman por el metabolismo secundario de

la paraxantina por CYP1A2, CYP2A6, NAT2 y XDH (también conocida como xantina oxidasa o XO) (Begas *et al.,* 2007). Estudios *in vitro* en líneas celulares muestran la participación de CYP2E1 en la formación de teobromina y teofilina, mientras que los estudios de proteínas recombinantes en microsomas no apoyan esto, sino que sugieren que contribuye a la formación de ácido 1,3,7-trimetilúrico (Gu *et al.,* 1992; Kot & Daniel, 2008). Experimentos en microsomas han demostrado que CYP2C8, CYP2C9 y CYP3A4 también participan en el metabolismo primario de la cafeína (Gu *et al.,* 1992; Kot & Daniel, 2008; Kot & Daniel, 2008ª).

1.4 La cafeína como tratamiento sintomático en la enfermedad de Parkinson

Los mecanismos por los que la cafeína produce activación motriz dependen principalmente de su capacidad de liberar los frenos presináptico y postsináptico que la adenosina impone sobre la neurotransmisión dopaminérgica estriatal al actuar sobre distintos heterómeros de receptores de adenosina localizados en distintos elementos del módulo espinal estriatal (MEE) (Ferre, 2008). Sin embargo, esto ocurre en condiciones normales, cuando no hay ningún déficit en la neurotransmisión dopaminérgica. Como ya se ha mencionado, la depleción central de dopamina o el bloqueo de los receptores dopaminérgicos deteriora significativamente los efectos motores de la cafeína (Ferré, 1992; Garrett & Griffiths, 1997). Por otro lado, si el déficit de la neurotransmisión dopaminérgica es permanente o lo bastante prolongado, la cafeína u otros antagonistas de adenosina no selectivos, o bien selectivos para el receptor A2A, pueden revertir la hipocinesia resultante de dicha deficiencia. Por ejemplo, unas pocas horas después de la administración de reserpina a roedores, la cafeína (u otros antagonistas de adenosina) es incapaz de producir activación motriz, mientras que unas 24 h después da lugar a una activación motriz significativa (Ferré, 1991; Popoli, 1991). Como es de esperar, bioquímicamente la cafeína y los antagonistas de adenosina A2A selectivos revierten el aumento de la fosforilización proteica y expresión génica que se produce en la neurona espinosa mediana (NEM) encefalinérgica en dichas condiciones experimentales (Aoyama, 2000; Zahniser *et al*., 2000; Chen *et al*., 2001; Kim & Palmiter, 2003). Es bien conocido que en la enfermedad de Parkinson se produce una deficiencia de dopamina, como consecuencia de la degeneración de las vías dopaminérgicas centrales, y que el principal

tratamiento sintomático es el sustitutivo, con la administración de L-DOPA (precursor de la dopamina) u otros agonistas dopaminérgicos directos. Por consiguiente, sería de esperar que la cafeína, al igual que antagonistas A2A selectivos, pudiera utilizarse como agente antiparkinsoniano, tanto sola (para bloquear la señalización desinhibida del receptor A2A) como asociada a agonistas dopaminérgicos (para potenciar la señalización del receptor D2).

1.5 La cafeína como tratamiento neuroprotector en la enfermedad de Parkinson

Otro aspecto que ha llamado la atención respecto a la posible aplicación de la cafeína en la enfermedad de Parkinson es su posible efecto neuroprotector, particularmente para las neuronas dopaminérgicas. En un principio, una serie de estudios epidemiológicos encontraron una relación inversa entre el consumo de cafeína y el riesgo de desarrollar la enfermedad (Ross *et al*., 2000; Ascherio *et al*., 2001; Hernán *et al*., 2002). Estudios preclínicos indican que la cafeína y, en particular, los antagonistas A2A protegen de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas inducida por distintas neurotoxinas (Chen *et al*., 2000; Ikeda *et al*., 2002). El mecanismo de acción encargado de estos efectos neuroprotectores de la cafeína está todavía por determinar. Es poco probable que se trate de un efecto directo sobre las neuronas dopaminérgicas, dada la escasa o nula expresión de receptores A2A en ellas (Ferré *et al*., 1997; Rosin *et al*., 2003; Ferré *et al*., 2007). En resumen, los estudios preclínicos indican que, en ciertas condiciones experimentales, la cafeína y los antagonistas de adenosina A2A protegen a las neuronas dopaminérgicas de los efectos de ciertas neurotoxinas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Analizar los efectos de la cafeína en un modelo computacional de neurona dopaminérgica en relación a la enfermedad de Parkinson.

2.2 Objetivos específicos

- Elaborar un modelo computacional de neurona dopaminérgica en relación a la enfermedad de Parkinson.
- Integrar en el modelo elaborado el conocimiento actual en metabolismo de cafeína.
- Evaluar el efecto que a nivel metabólico puede tener la cafeína en el modelo elaborado.
- Identificar los posibles mecanismos moleculares de neuroprotección surgidos a partir del consumo de cafeína.

3. Metodología

3.1 Modelo computacional

Para la construcción del modelo computacional de neurona dopaminérgica en relación a la enfermedad de Parkinson, inicialmente, se tomó como base el conjunto de reacciones de neurona que dan flujo a la función objetivo de mantenimiento celular (Çakir *et al.,* 2007) y en base a la reconstrucción metabólica humana RECON 2.04 (Thiele *et al.,* 2013). Adicionalmente, en cuanto al componente dopaminérgico, se añadieron las reacciones metabólicas relacionadas con síntesis, metabolismo y transporte de dopamina (Tabla 1). Cada una de las reacciones fue revisada manualmente y con base en la literatura y bases de datos relevantes se estableció su validez biológica.

Tabla 1. Componentes y reacciones introducidas al modelo computacional base de neurona dopaminérgica.

Componente	ID	Reacción
Mantenimiento celular	maintenance_reaction	0.6 ala_L[c] + 0.033 amp[c] + 0.377 arg_L[c] + 0.2881 asn_L[c] + 0.359 asp_L[c] + 43.153 atp[c] + 0.018 chsterol[c] + 0.003 clpn_hs[c] + 0.0551 cmp[c] + 0.145 cys_L[c] + 0.0148 damp[c] + 0.0099 dcmp[c] + 0.0099 dgmp[c] + 0.0148 dtmp[c] + 0.322 gln_L[c] + 0.386 glu_L[c] + 0.538 gly[c] + 0.0624 gmp[c] + 43.153 h2o[c] + 0.143 his_L[c] + 0.324 ile_L[c] + 0.564 leu_L[c] + 0.57 lys_L[c] + 0.138 met_L[c] + 0.01 pail_hs[c] + 0.069 pchol_hs[c] + 0.026 pe_hs[c] + 0.001 pglyc_hs[c] + 0.219 phe_L[c] + 0.313 pro_L[c] + 0.003 ps_hs[c] + 0.43 ser_L[c] + 0.008 sphmyln_hs[c] + 0.386 thr_L[c] + 0.044 trp_L[c] + 0.0182 tyr_L[c] + 0.033 ump[c] + 0.416 val_L[c] => 43.153 adp[c] + 43.153 h[c] + 43.153 pi[c]
Síntesis de Dopamina	EX_tyr_L(e) TYR3MO2 3HLYTCL	tyr_L[e] <=> o2[c] + thbpt[c] + tyr_L[c] -> 34dhphe[c] + thbpt4acam[c] h[c] + 34dhphe[c] -> co2[c] + dopa[c]
Transporte de Dopamina	DOPAt4_2_r DOPAtu EX_dopa(e) r2312	2 na1[e] + dopa[e] <=> 2 na1[c] + dopa[c] dopa[c] => dopa[e] dopa[e] <=> hco3[c] + gthrd[c] + dopa[e] <=> hco3[e] + dopa[c] + gthrd[e]

La reacción de mantenimiento celular contiene 20 aminoácidos, dentro de los que se encuentran aminoácidos esenciales (Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptófano, Valina, Histidina y Arginina) y no esenciales (Alanina, Tirosina, Aspartato, Cisteína, Glutamato, Glutamina, Glicina, Prolina, Serina y Asparagina), los cuales son necesarios para el adecuado funcionamiento metabólico de neurona, es decir, con estos metabolitos la célula tiene la capacidad de multiplicarse y producir los metabolitos primarios y secundarios como resultado final de su proceso metabólico. Esta reacción también tiene compuestos como colesterol, cardiolipina, ATP, 1-fosfatidil-1D-mio-

inositol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina y esfingomielina. Como productos finales esta reacción produce energía, hidrógeno y fósforo inorgánico.

Dentro de las reacciones de transporte de dopamina se encuentran la reacción EX_dopa(e) que es la principal entrada de dopamina extracelular al sistema, DOPAt4_2_r que se refiere al transporte de dopamina vía sodio, del medio extracelular al citoplasmático, DOPAtu, referente al transporte de dopamina del medio citoplasmático al extracelular, la reacción r2312 es una reacción de transporte de dopamina del medio extracelular al citoplasmático y de transporte de ácido carbónico y glutatión reducido del medio citoplasmático al extracelular y finalmente la reacción DOPAVESSEC, que se refiere al transporte de dopamina vía vesículas. En cuanto a las reacciones de síntesis de dopamina inicialmente se encuentra la reacción EX_tyr_L(e), que se refiere a la entrada de L-tirosina del medio extracelular, la reacción TYR3MO2, referente a la conversión de L-tirosina a L-dopa y la reacción 3HLYTCL que es la conversión de L-dopa a Dopamina.

Para la caracterización de neurona saludable y neurona Parkinson, se llevó a cabo el uso de datos de expresión de sustancia nigra de muestras postmortem de cerebro de pacientes con EP obtenidos por Lesnick *et al.,* (2007) y actualizados en octubre de 2016, en el cual se utilizaron microarrays para detallar el programa global de expresión génica subyacente a la enfermedad de Parkinson. Se utilizaron tejidos de sustancia nigra de cerebro postmortem de pacientes sanos y pacientes con enfermedad de Parkinson para extracción de RNA e hibridación en microarrays Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0, se realizaron 9 réplicas para pacientes sanos y 16 réplicas para los pacientes con enfermedad de Parkinson.

Para la integración de esta información en el modelo computacional, se utilizó el paquete en R exp2flux, diseñado e implementado en el grupo de investigación de Bioinformática y Biología de Sistemas de la Universidad Nacional de Colombia (Osorio *et al.,* 2016). Este paquete convierte los valores de expresión génica en límites FBA para cada reacción basada en las reglas booleanas descritas en su GPR asociado.

3.2 Integración de metabolismo de cafeína

Para la introducción del metabolismo de cafeína, se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva de dicho proceso, y el desarrollo del mismo en humanos (Callahan *et al.,* 1982; Sved *et al.,* 1976; Berthou *et al.,* 1991; Nehlig *et al.,* 1992; Tassaneeyakul *et al.,* 1994; Dager *et al.,* 1999) y tomando como base lo reportado en la base de datos de KEGG (Kanehisa & Goto, 2000; Kanehisa *et al.,* 2016) (Tabla 2).

En la tabla 2 se observa el conjunto de reacciones referentes al metabolismo de la cafeína, que fueron integradas al modelo metabólico de neurona dopaminérgica. Se tienen 2 reacciones de transporte Caffeine1, referente a la entrada de cafeína del medio extracelular y Caffeine2, referente a la entrada de cafeína del medio extracelular al citoplasmático.

Tabla 2. Reacciones del metabolismo de cafeína integradas al modelo metabólico de neurona dopaminérgica en relación a la enfermedad de Parkinson.

ID	Reacción
Caffeine1	caffeine[e] <=>
Caffeine2	caffeine[e] <=> caffeine[c]
Caffeine3	1_7dmxan[c] + o2[c] + h2o[c] => 1_7dmurate[c] + h2o2[c]
Caffeine4	1mxan[c] + h2o[c] + o2[c] => 1murate[c] + h2o2[c]
Caffeine5	1_7dmxan[c] => 5a6f3murate[c]
Caffeine6	1_7dmxan[c] => 1_7dmurate[c]
Caffeine7	caffeine[c] + nadph[c] + o2[c] + h[c] => 1_7dmxan[c] + nadp[c] + fald[c] + h2o[c]
Caffeine8	1_7dmxan[c] => 1mxan[c]
Caffeine9	1murate[c] => urate[c]
Caffeine10	5a6f3murate[c] => urate[c]
Caffeine11	1_7dmurate[c] => urate[c]
Caffeine12	1_7dmxan[c] => xan[c]
Caffeine13	1mxan[c] => xan[c]

Se integraron subproductos del metabolismo de la cafeína que se ha demostrado están en humanos y de los cuales van a vías metabólicas de las Xantinas, dentro de este grupo se encuentran las reacciones de Caffeine3, referente a la hidrólisis de 1,7-dimetilxantina a ácido 1,7-dimetilurilúrico. Caffeine4 es la conversión de 1-metilxantina a ácido 1-metilúrico. Caffeine5, la conversión de 1,7-dimetilxantina a 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo. Caffeine6 es la conversión de 1,7-dimetilxantina a 1,7-dimetilurilúrico. Caffeine7 es la reacción principal de conversión de cafeína en 1,7-dimetilxantina. Caffeine8, referente a la conversión de 1,7-dimetilxantina a 1-metilxantina. Caffeine12

referente a la conversión de 1,7-dimetilxantina a xantina y la reacción Caffeine13 referente a la conversión de 1-metilxantina a xantina.

Finalmente, las reacciones pertenecientes a las vías del ácido úrico, Caffeine9 es la conversión de ácido 1-metilúrico a urato. Caffeine10, conversión de 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo a urato y finalmente la reacción de Caffeine11, conversión de ácido 1,7-dimetilurilúrico a urato.

3.3 Evaluación del efecto metabólico de la cafeína

Para evaluar los efectos de la cafeína a nivel metabólico en el modelo computacional de neurona dopaminérgica, se desarrollaron cuatro experimentos diferentes (Figura 6):

1. Neurona dopaminérgica saludable.
2. Neurona dopaminérgica saludable + cafeína.
3. Neurona Parkinson.
4. Neurona Parkinson + cafeína.

Todos estos experimentos se llevaron a cabo teniendo como función objetivo la reacción de mantenimiento celular.

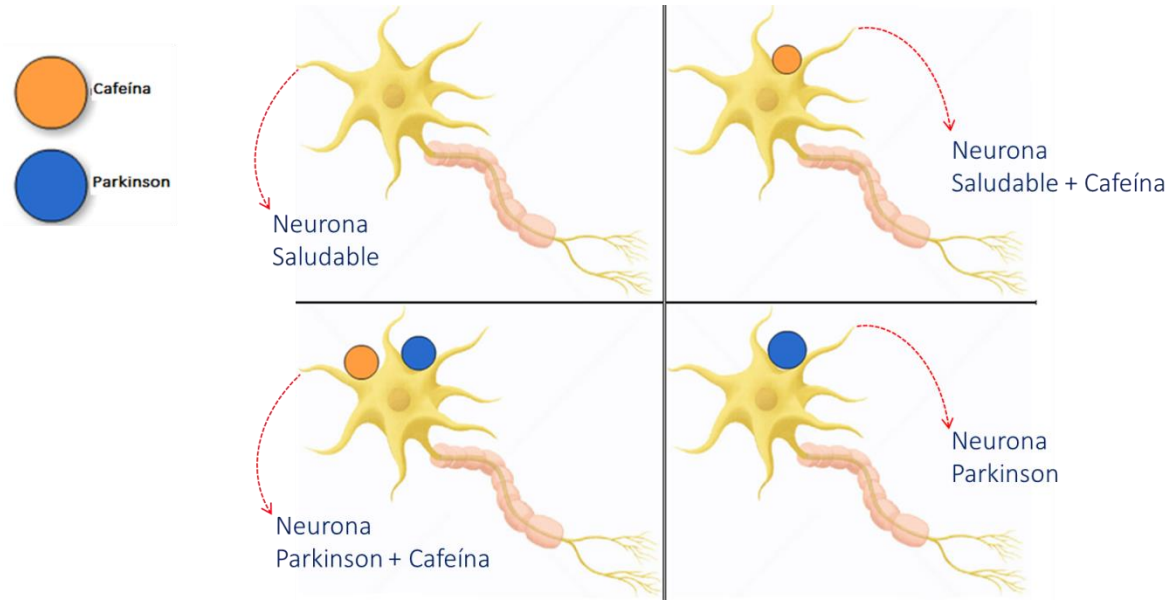


Figura 6. Diseño experimental para evaluar el efecto metabólico de la cafeína en el modelo computacional.

Mediante FBA se estableció el conjunto de reacciones que optimizaron la función objetivo de mantenimiento celular en neurona saludable y neurona saludable + cafeína, esto con el fin de definir el fenotipo metabólico de una célula sana y una célula sana + cafeína, los cuales fueron utilizados como control negativo (neurona saludable) y control positivo (neurona saludable + cafeína) para luego observar las diferencias en el metabolismo de los fenotipos metabólicos encontrados en los modelos de neurona Parkinson y neurona Parkinson + cafeína.

Adicionalmente mediante FVA se establecieron los rangos de flujo mínimo y máximo para cada una de las reacciones de los modelos, con el fin de determinar el rango en el que se puede llevar a cabo cada una de las reacciones en los diferentes escenarios evaluados. Estos análisis anteriormente mencionados, se llevaron a cabo en MATLAB-COBRA Toolbox (Schellenberger *et al.,* 2011).

3.4 Identificación de mecanismos moleculares de neuroprotección

Luego de obtener los fenotipos metabólicos para cada uno de los escenarios, se interpretaron biológicamente cada uno de los resultados obtenidos. Luego se propusieron los posibles mecanismos moleculares para finalmente proponer un efecto neuroprotector de la cafeína.

4. Resultados y discusión

4.1 Modelo computacional

Se obtuvo un modelo computacional de neurona dopaminérgica con un total de 2015 reacciones, 1474 metabolitos y 943 genes asociados. En los modelos sin cafeína se inhibieron las 13 reacciones de cafeína, es decir, en los modelos (-) de cafeína se knoquearon las reacciones de cafeína para simular la no entrada de cafeína al sistema. Es importante destacar que el modelo computacional desarrollado ha sido sometido a un proceso de validación húmeda y proviene de datos biológicos usados.

El modelo computacional adicionalmente cuenta con 8 compartimentos, dentro de los cuales se encuentran citoplasma [c], mitocondria [m], extracelular [e], lisosoma [l], nuclear [n], retículo endoplasmático [r], aparato de Golgi [g] y peroxisoma [p].

4.1.1 Determinación de la distribución de flujos metabólicos

Se realizó el análisis de balance de flujo para los modelos de neurona saludable y neurona Parkinson, con el fin de observar el conjunto de reacciones que participan de la solución en el modelo de neurona dopaminérgica, en estos dos escenarios. Estos dos modelos fueron utilizados como controles para la evaluación posterior del conjunto de reacciones que se llevaron a cabo en neurona saludable + cafeína y neurona Parkinson + cafeína.

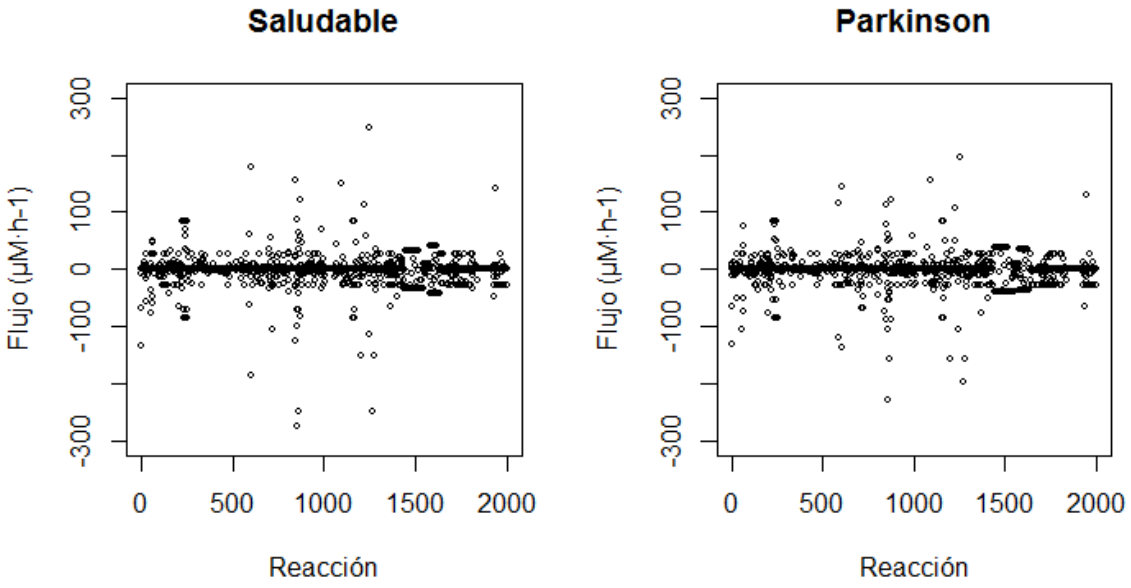


Figura 7. Análisis de Balance de Flujo de los modelos saludable y Parkinson.

En la figura 7 se puede observar la variación de flujos en ambos escenarios, y en el total de 2015 reacciones. En neurona saludable se presentan flujos de -300 a 300 $\mu M \cdot h^{-1}$. En el caso de neurona Parkinson se presentan flujos de -200 a 200 $\mu M \cdot h^{-1}$. Esto indica una menor distribución de los flujos en el escenario de Parkinson, lo que podría deberse a las restricciones de los datos de expresión génica utilizados para la simulación de la enfermedad en el modelo computacional y podría sugerir que parte de las características de la EP surgen de una menor capacidad de síntesis de algunos metabolitos. En el Anexo 1, se detalla la distribución de flujos de los modelos neurona saludable y neurona Parkinson.

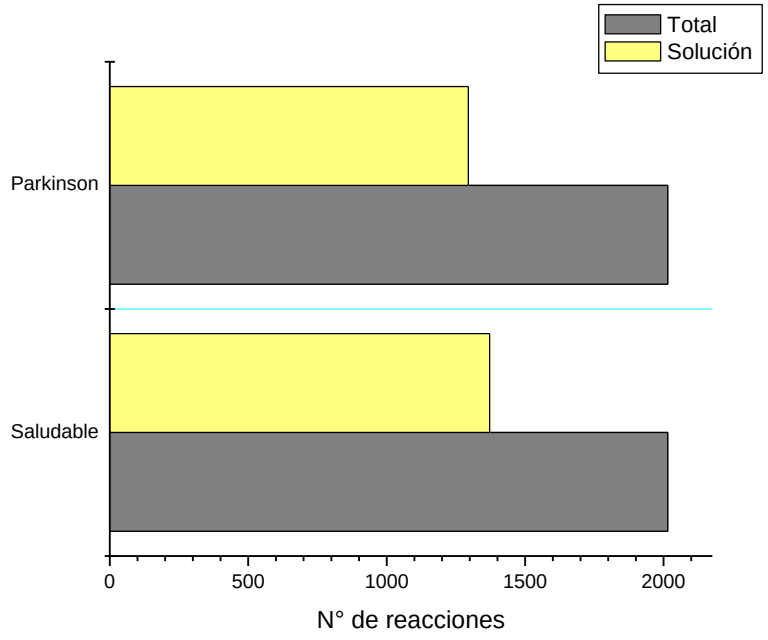


Figura 8. Número de reacciones que participan de la solución en el modelo de neurona dopaminérgica para neurona saludable y neurona Parkinson.

La figura 8 muestra el número de reacciones que participan en la solución del modelo computacional, obteniendo como resultado que en neurona saludable de un total de 2015 reacciones, 1372 reacciones participan en la solución del modelo, y para neurona Parkinson participan 1295 reacciones, es decir, 77 reacciones de diferencia entre las dos simulaciones. Resultados que están totalmente ligados a las variaciones de flujos observados anteriormente en la figura 7, ya que para una mayor cantidad de reacciones involucradas en la solución del modelo [1372 reacciones], hay un mayor valor de flujo [-300 a 300 $\mu M \cdot h^{-1}$], y para un menor valor de reacciones que intervienen en la solución [1295 reacciones], hay un menor valor de flujo [-200 a 200 $\mu M \cdot h^{-1}$].

4.1.2 Rangos de flujos mínimos y máximos para las reacciones

Dado que el resultado del análisis por FBA nos determina un valor único de flujo para cada reacción que participa en la optimización de la función objetivo celular, definida en

este caso como mantenimiento celular, era pertinente establecer si existían otros valores de flujo que en su conjunto optimizaran de igual manera dicha función objetivo. Así, la identificación del rango de flujo posible en el que puede variar cada reacción en la solución, nos permitiría tener una idea más global del escenario metabólico en el que se encuentran las posibilidades del sistema. De esta manera, con el fin de encontrar el rango de flujo mínimo y máximo para cada una de las reacciones en los modelos de neurona saludable y neurona Parkinson, se llevó a cabo un FVA, que se utilizó también como control para comparar con los modelos de neurona saludable + cafeína y neurona Parkinson + cafeína.

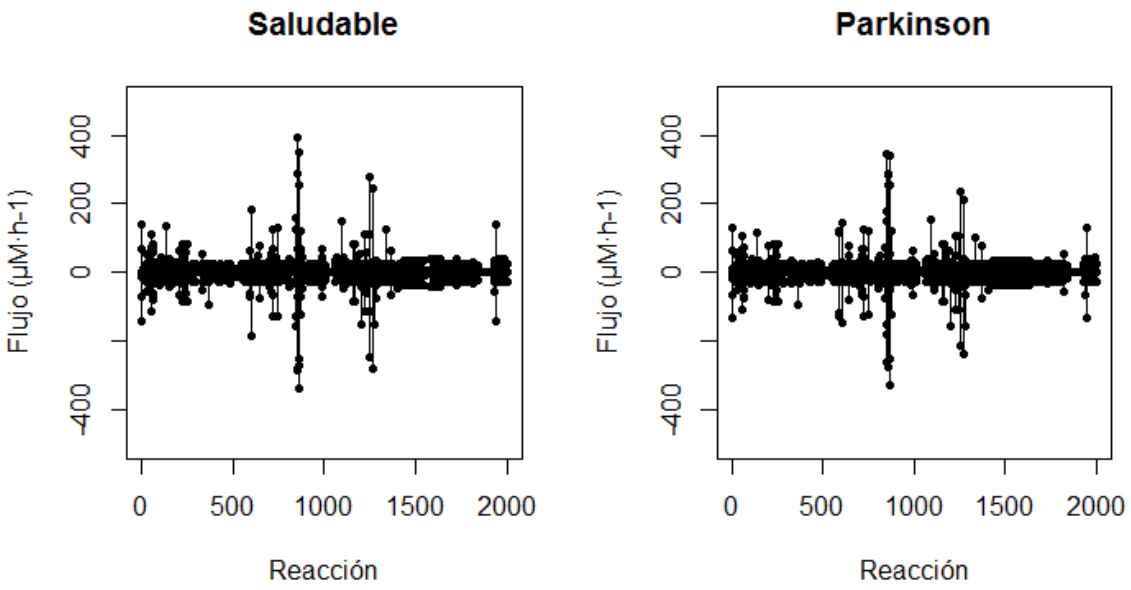


Figura 9. Análisis de Variabilidad de Flujo para los modelos saludable y Parkinson.

En la figura 9 se pueden observar como varían los flujos de las reacciones en relación a los dos modelos de neurona saludable y neurona Parkinson. En el modelo de neurona saludable se observan que los flujos varían entre -400 a 400 $\mu M \cdot h^{-1}$, al contrario que en el modelo de neurona Parkinson, los flujos varían entre -350 a 350 $\mu M \cdot h^{-1}$. Se observa una variación de los flujos muy similar a la obtenida en la determinación de los flujos metabólicos, a diferencia de que, en este caso se amplió el rango de flujo. Sin embargo, se puede inferir que, en general cuando la célula está restringida, es decir, cuando se está simulando enfermad, los flujos de las reacciones del modelo tienen menos libertad, es decir, tiene menor rango de flujo mínimo y máximo para llevarse a cabo.

En las tablas 3 y 4 se pueden observar diferentes rangos de flujos mínimos y máximos para 27 reacciones elegidas, ya que son de gran importancia metabólica y debido a que varios de estos compuestos pertenecen a aminoácidos esenciales y no esenciales para el mantenimiento celular de la neurona, además de compuestos necesarios como O_2, CO_2 y H_2O, y las reacciones de transporte de dopamina para los modelos de neurona saludable y neurona Parkinson.

Tabla 3. Lower Bound y Upper Bound de reacciones de importancia metabólica en el modelo de neurona saludable.

ID Reacción	LB	UB	ID Reacción	LB	UB
CO2t	-26.4	26.4	EX_his_L(e)	-13.26	-0.0025
DOPAt4_2_r	-52.68	52.68	EX_ile_L(e)	-1	-0.0058
DOPAtu	-26.7	26.7	EX_lac_L(e)	-1	13.16
EX_ala_L(e)	-1	13.16	EX_leu_L(e)	-1	-0.010
EX_arg_L(e)	-1	-0.0068	EX_lys_L(e)	-0.0103	-0.010
EX_asn_L(e)	-1	-0.0052	EX_met_L(e)	-0.0024	-0.0024
EX_asp_L(e)	-1	0	EX_o2(e)	-1.23	-1.19
EX_co2(e)	1.19	1.23	EX_phe_L(e)	-0.0132	-0.0039
EX_cys_L(e)	-92	0	EX_pro_L(e)	-1	3.81
EX_dopa(e)	0	0	EX_ser_L(e)	-1	13.16
EX_glc(e)	- 0.1	6.013	EX_thr_L(e)	-1	-0.0069
EX_gln_L(e)	-1	8.43	EX_trp_L(e)	-0.00079	-0.00079
EX_h2o(e)	-24.21	23.96	EX_tyr_L(e)	-0.0041	0.0089
			EX_val_L(e)	-1	-0.0075

Tabla 4. Lower Bound y Upper Bound de reacciones de importancia metabólica en el modelo de neurona Parkinson.

ID Reacción	LB	UB	ID Reacción	LB	UB
CO2t	-26.364	26.364	EX_his_L(e)	-9.52	-0.0025
DOPAt4_2_r	-15.13	15.13	EX_ile_L(e)	-1	-0.0058
DOPAtu	-33.67	33.67	EX_lac_L(e)	-1	11.96
EX_ala_L(e)	-1	11.96	EX_leu_L(e)	-1	-0.01
EX_arg_L(e)	-1	-0.0068	EX_lys_L(e)	-0.0103	-0.01
EX_asn_L(e)	-1	-0.0052	EX_met_L(e)	-0.0024	-0.0024
EX_asp_L(e)	-1	2.8e-28	EX_o2(e)	-1.23	-1.193
EX_co2(e)	1.19	1.23	EX_phe_L(e)	-0.0132	-0.0039
EX_cys_L(e)	-91.87	0	EX_pro_L(e)	-1	3.74
EX_dopa(e)	0	0	EX_ser_L(e)	-1	12
EX_glc(e)	-0.16	6.24	EX_thr_L(e)	-1	-0.0069
EX_gln_L(e)	-1	8.72	EX_trp_L(e)	-0.00079	-0.00079
EX_h2o(e)	-23.52	26.12	EX_tyr_L(e)	-0.0041	0.0089
			EX_val_L(e)	-1	-0.0075

4.2 Integración de metabolismo de cafeína

4.2.1 Determinación de la distribución de flujos metabólicos

Se realizó el análisis de balance de flujo para los modelos de neurona saludable + cafeína y neurona Parkinson + cafeína, con el fin de observar el conjunto de reacciones que se llevaron a cabo cuando hay entrada de cafeína al sistema. Estos fenotipos metabólicos fueron comparados con los obtenidos con los modelos de neurona saludable y neurona Parkinson.

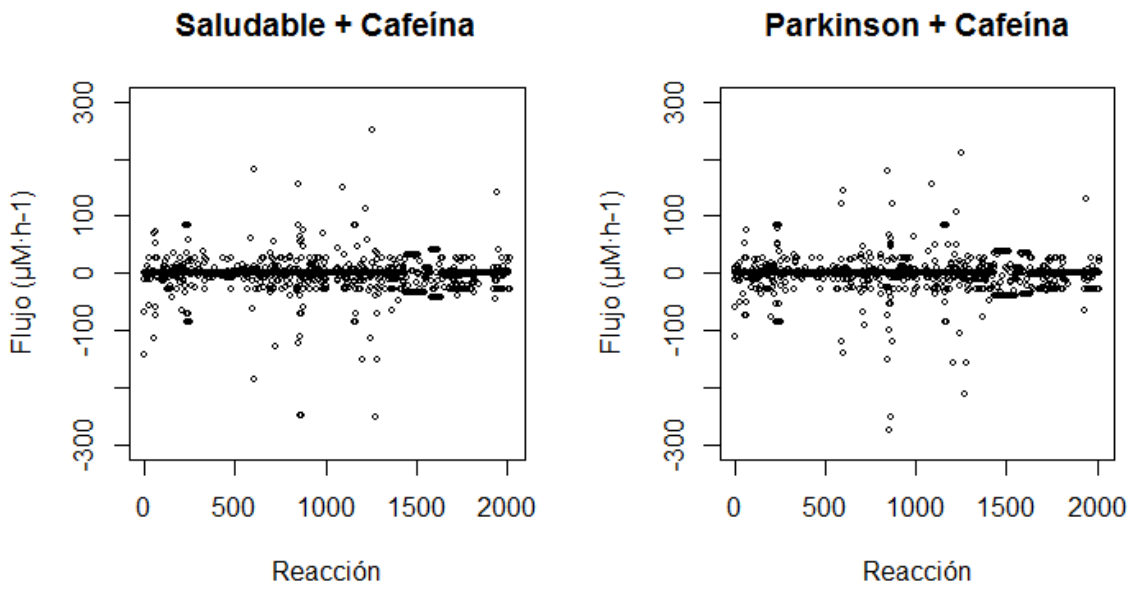


Figura 10. Análisis de Balance de Flujo para los modelos saludable + cafeína y Parkinson + cafeína.

En la figura 10 se puede observar como varían los flujos en ambos escenarios. En neurona saludable + cafeína se presentan flujos de -250 a 250 $\mu M \cdot h^{-1}$, por el contrario, en neurona Parkinson + cafeína se presentan flujos de -300 a 300 $\mu M \cdot h^{-1}$. En el Anexo 2, se puede observar la distribución de flujos de los modelos saludable + cafeína y Parkinson + cafeína de una manera más detallada. Esta variación de flujos en el modelo de Parkinson + cafeína, podría indicar que la entrada de cafeína al sistema aumenta los flujos de las reacciones del modelo de neurona Parkinson, con este aumento, se podría deducir que aumentó el conjunto de reacciones que participaron de la solución en el modelo de neurona dopaminérgica, y como resultado a esto se observa mayor flujo en este escenario.

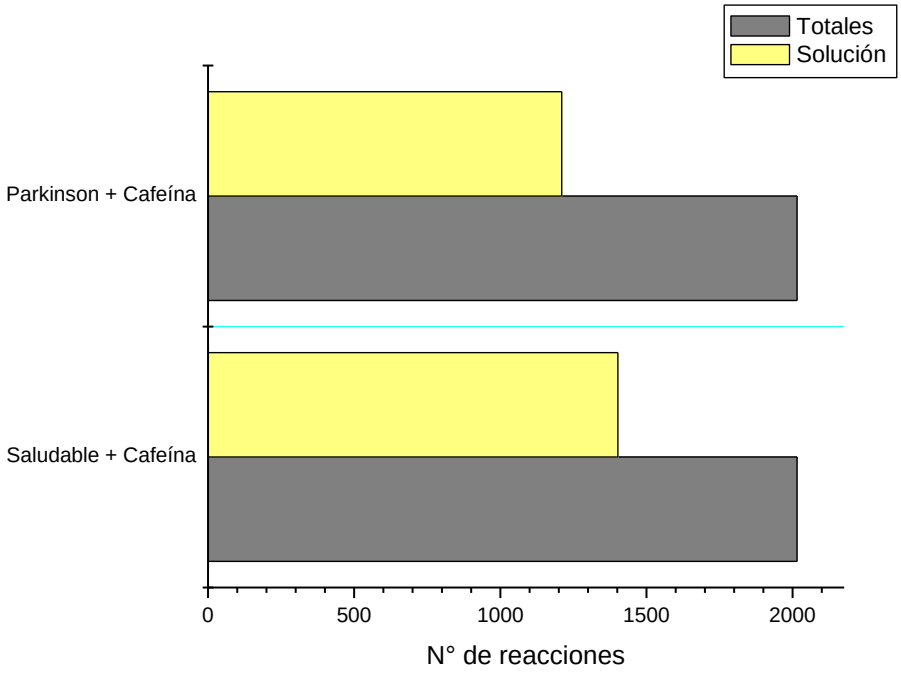


Figura 11. Número de reacciones que participan de la solución en el modelo de neurona dopaminérgica para neurona saludable + cafeína y neurona Parkinson + cafeína.

La figura 11 muestra el número de reacciones que participan en la solución del modelo computacional, obteniendo como resultado que en neurona saludable + cafeína de un total de 2015 reacciones, 1402 reacciones participan en la solución del modelo, y para neurona Parkinson + cafeína, participan 1210 reacciones, es decir, 192 reacciones de diferencia entre las dos simulaciones, valor mucho mayor al obtenido para los modelos negativos para cafeína. Resultados que están totalmente ligados a las variaciones de flujos observados anteriormente en la figura 10, y que se comportan de manera opuesta a los modelos negativos para cafeína en los que existe una correlación positiva entre el número de reacciones y el rango de flujos, ya que en el caso de los positivos para cafeína, se encontró que en el caso de célula saludable + cafeína a mayor número de reacciones que participen en la solución del modelo [1402 reacciones], se presenta un menor valor de flujo en el fenotipo metabólico [-250 a 250 µM·h-1] y en el caso de célula Parkinson + cafeína a menor número de reacciones que participen en la solución [1210 reacciones], existe un mayor valor de flujo en el fenotipo metabólico [-300 a 300 µM·h-1], mostrando una correlación negativa . Cabe resaltar, que el número de reacciones que estuvieron involucradas en la solución para los modelos de saludable + cafeína y

Parkinson + cafeína, corresponden al número de reacciones más alto y más bajo, respectivamente, de las 4 simulaciones realizadas..

4.2.2 Rangos de flujos mínimos y máximos para las reacciones

Con el fin de encontrar el rango de flujo mínimo y máximo para cada una de las reacciones en los modelos de neurona saludable + cafeína y neurona Parkinson + cafeína, se llevó a cabo un FVA, el cual fue comparado con los rangos de flujos mínimos y máximos encontrados en los modelos de neurona saludable y neurona Parkinson, con el fin de observar la variación en los rangos de estos flujos cuando hay entrada de cafeína al sistema.

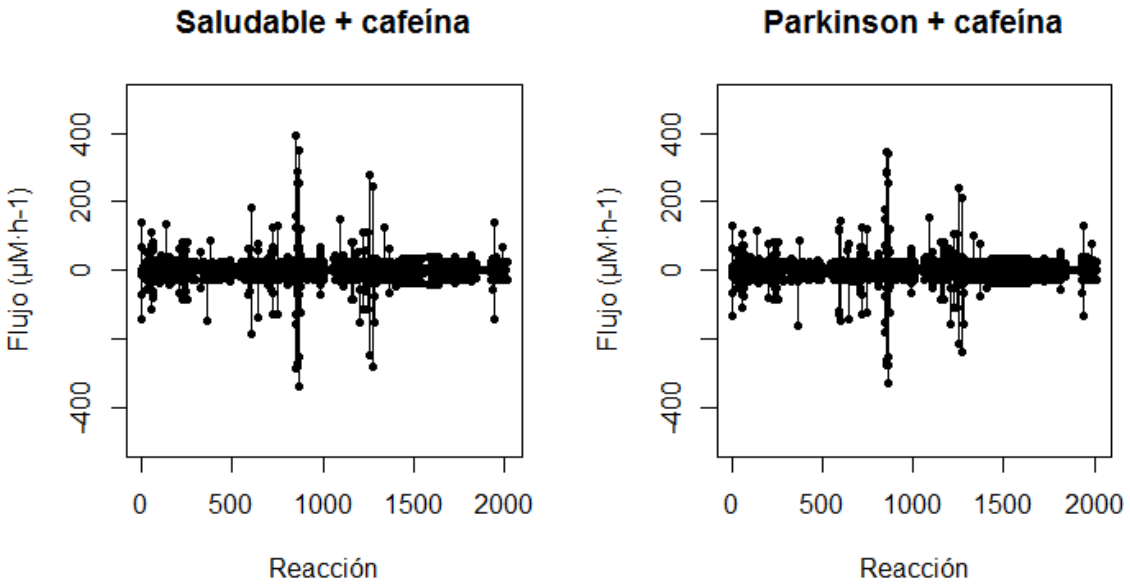


Figura 12. Análisis de Variabilidad de Flujo de los modelos saludable + cafeína y Parkinson + cafeína.

En la figura 12 se puede observar como varían los flujos de las reacciones en relación a los dos modelos de neurona saludable + cafeína y neurona Parkinson + cafeína. En el modelo de neurona saludable + cafeína se observa que los flujos varían entre -400 a 400 $\mu M \cdot h^{-1}$, al igual que en el modelo de neurona Parkinson + cafeína. Esto podría indicar que al contrario de lo encontrado en neurona Parkinson, la entrada de cafeína al sistema no influye en la variación de flujos mínimos y máximos del modelo Parkinson + cafeína, es

decir, no influye en el rango en el que pueden llevarse a cabo cualquiera de las reacciones que componen el sistema.

En las tablas 5 y 6 se pueden observar diferentes rangos de flujos mínimos y máximos para 27 reacciones elegidas, ya que son de gran importancia metabólica y debido a que varios de estos compuestos pertenecen a aminoácidos esenciales y no esenciales para el mantenimiento celular de la neurona, además de compuestos necesarios como O_2, CO_2 y H_2O, y las reacciones de transporte de dopamina para los modelos de neurona saludable + cafeína y neurona Parkinson + cafeína.

Tabla 5. Lower Bound y Upper Bound de reacciones de importancia metabólica en el modelo de neurona saludable + cafeína.

ID Reacción	LB	UB	ID Reacción	LB	UB
CO2t	-26.47	26.47	EX_his_L(e)	-13.32	-0.0025
DOPAt4_2_r	-52.68	52.68	EX_ile_L(e)	-1	-0.0058
DOPAtu	-26.76	26.76	EX_lac_L(e)	-1	13.16
EX_ala_L(e)	-1	13.16	EX_leu_L(e)	-1	-0.010
EX_arg_L(e)	-1	-0.0068	EX_lys_L(e)	-0.010	-0.010
EX_asn_L(e)	-1	-0.0052	EX_met_L(e)	-0.0024	-0.0024
EX_asp_L(e)	-1	0	EX_o2(e)	-1.23	-1.193
EX_co2(e)	1.193	1.23	EX_phe_L(e)	-0.013	-0.0039
EX_cys_L(e)	-145.71	0	EX_pro_L(e)	-1	4.40
EX_dopa(e)	0	0	EX_ser_L(e)	-1	13.16
EX_glc(e)	-0.16	6.01	EX_thr_L(e)	-1	-0.0069
EX_gln_L(e)	-1	12.26	EX_trp_L(e)	-0.00079	-0.00079
EX_h2o(e)	-26.98	86.18	EX_tyr_L(e)	-0.0041	0.0089
			EX_val_L(e)	-1	-0.0075

Tabla 6. Lower Bound y Upper Bound de reacciones de importancia metabólica en el modelo de neurona Parkinson + cafeína.

ID Reacción	LB	UB	ID Reacción	LB	UB
CO2t	-26.364	4.65	EX_his_L(e)	-9.52	0
DOPAt4_2_r	-15.13	0	EX_ile_L(e)	-1	-2.5e-28
DOPAtu	-33.67	0	EX_lac_L(e)	-1	0
EX_ala_L(e)	-1	3.61	EX_leu_L(e)	-1	0
EX_arg_L(e)	-1	0.37	EX_lys_L(e)	-0.010	11.86
EX_asn_L(e)	-1	26.36	EX_met_L(e)	-0.0024	2.0e-27
EX_asp_L(e)	-1	2.66	EX_o2(e)	-1.23	0
EX_co2(e)	1.19	10.05	EX_phe_L(e)	-0.013	-0.0001
EX_cys_L(e)	-160.47	7.55	EX_pro_L(e)	-1	0
EX_dopa(e)	0	19.29	EX_ser_L(e)	-1	1.3e-14
EX_glc(e)	-0.16	-0.0018	EX_thr_L(e)	-1	4.60
EX_gln_L(e)	-1	0	EX_trp_L(e)	-0.00079	-0.0022
EX_h2o(e)	-26.66	0.99	EX_tyr_L(e)	-0.0041	-0.0020
			EX_val_L(e)	-1	2.01

4.3 Efecto metabólico de la cafeína

A partir de cada simulación realizada, se obtuvo un fenotipo metabólico diferente para cada escenario, estos fueron comparados y se obtuvieron los siguientes resultados:

En cuanto a los fenotipos metabólicos de la neurona saludable y saludable + cafeína (Figura 13), se observaron cambios en los flujos de varias reacciones importantes a nivel metabólico.

En la figura 13, se puede observar como varían los flujos de las reacciones con el ingreso de cafeína al sistema. La reacción de transporte H_2O (EX_h2o(e)), que en escenario saludable tiene un flujo de -6 $\mu M \cdot h^{-1}$ y cuando hay cafeína su flujo aumenta a -8 $\mu M \cdot h^{-1}$, esto indica mayor entrada de agua al sistema en presencia de cafeína, y finalmente, con respecto a los niveles de oxígeno no se presentaron cambios en ninguno de los dos escenarios, ya que se mantuvo constante en (-1,19 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1,19 $\mu M \cdot h^{-1}$), indicando consumo de O_2, como proceso normal de la respiración.

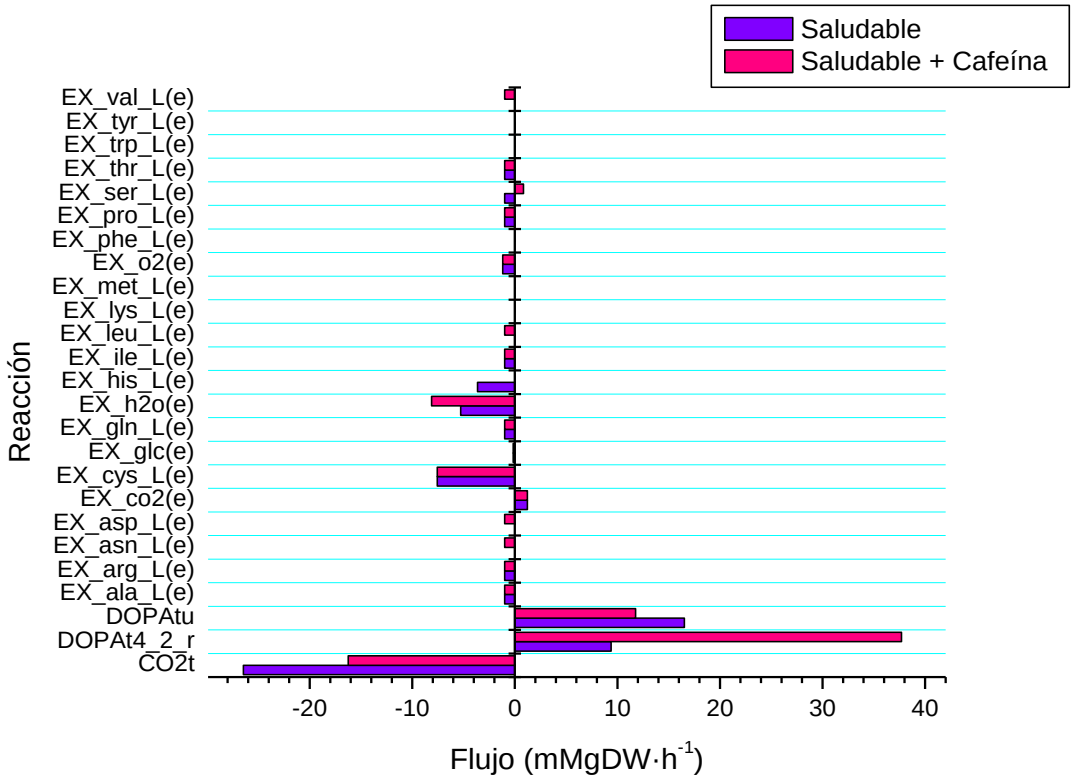


Figura 13. Cambios en reacciones de importancia metabólica en los modelos saludable y saludable + cafeína.

El cambio más relevante en este fenotipo metabólico es el aumento del flujo en la reacción DOPAt4_2_r referente al transporte de dopamina vía sodio (DAT) (9,3 $\mu M \cdot h^{-1}$ a 37,6 $\mu M \cdot h^{-1}$), lo que es congruente con lo reportado por varios autores, quienes afirman que de acuerdo con el mecanismo de acción de los psicoestimulantes, como la cafeína, estos son clasificados como bloqueadores de la recaptación de dopamina o como liberadores de la misma (Torres, 2003; Elliot, 2005), al estar esta reacción directamente ligada con el transportador activo de dopamina (DAT), nuestro modelo podría indicar que la cafeína está ejerciendo un efecto positivo en la recaptación de Dopamina incrementando así la concentración de la misma en el espacio intracelular.

Adicionalmente, otros estudios plantean la hipótesis de que la cafeína al momento de ingresar al organismo bloquea los receptores de adenosina, antagonizando los efectos de la adenosina endógena, y facilitando la neurotransmisión dopaminérgica, liberando dopamina y potenciando los efectos de la estimulación del receptor dopaminérgico

(Martínez & Rubio, 2002; Solinas *et al.,* 2002; Volkow *et al.,* 2015). Sin embargo, esta hipótesis no es validada con los resultados obtenidos en la presente investigación debido a que el modelo no contempla información referente a los receptores de adenosina.

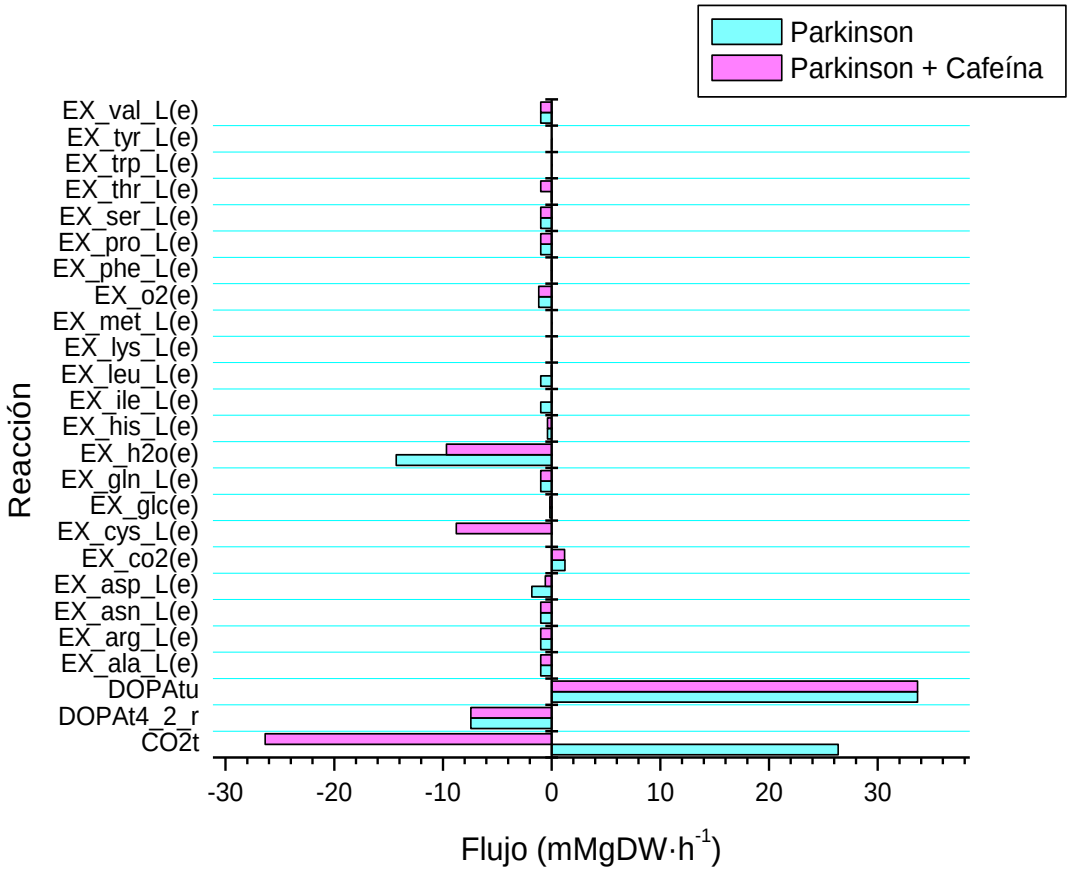


Figura 14. Cambios en reacciones de importancia metabólica en los modelos Parkinson y Parkinson + cafeína. Reacciones con valores muy cercanos a cero (ej. EX_tyr_L(e), EX_trp_L(e), EX_phe_L(e), EX_met_L(e), EX_lys_L(e)) aparecen sin barra en la gráfica, sin embargo, no significa sin embargo que no sean relevantes en los resultados ni en el metabolismo de la neurona.

En el fenotipo metabólico obtenido a partir de los modelos de neurona Parkinson y neurona Parkinson + cafeína (Figura 14), la reacción de transporte de CO2 (CO2t) tiene un flujo de (26,36 $\mu M \cdot h^{-1}$) para neurona Parkinson y (-26,36 $\mu M \cdot h^{-1}$) para neurona Parkinson + cafeína, lo que indica un flujo alto sin entrada de cafeína al sistema a comparación de lo observado con los escenarios de neurona saludable y saludable + cafeína, lo que sugiere que, en Parkinson, con o entrada de cafeína al sistema, los niveles

de transporte de CO_2 se ven afectados, debido a la gran disminución presentada. Estos resultados son de gran importancia ya que en EP se presenta un fenómeno llamado hipercapnia, en el que se presenta la elevación anormal en la concentración de dióxido de carbono (CO2) en el organismo (Briva *et al.,* 2010; Solomon & Collins, 2016), observando que cuando entra cafeína al sistema estos niveles de CO_2 disminuyen, indicando que probablemente la cafeína proteja al organismo de las altas concentraciones de CO_2 en el organismo, que pueden desencadenar en acidosis cerebral, debido al aumento de hidrogeniones que la hipocapnia causa, y que desencadena en deterioro del estado de energía cerebral o daño morfológico celular irreversible (Rehncrona, 1985).
Todo lo contrario, ocurre con el H2O (EX_h2o(e)), que en escenario Parkinson tiene un flujo de -14 µM·h-1 y cuando hay cafeína su flujo disminuye a -10 µM·h-1, y finalmente, con respecto a los niveles de oxígeno no se presentaron cambios en ninguno de los dos escenarios, ya que se mantuvo constante en (-1,19 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1,19 $\mu M \cdot h^{-1}$), al igual que en los escenarios de saludable y saludable + cafeína.

En la figura 14 se observa que no se presentaron variaciones en el flujo de la reacción DOPAt4_2_r, referente al transporte vía sodio de dopamina (-7,43 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -7,43 $\mu M \cdot h^{-1}$), y en la reacción DOPAtu, referente al transporte de dopamina del medio citoplasmático al extracelular (33,6 $\mu M \cdot h^{-1}$ a 33, 6 $\mu M \cdot h^{-1}$), en el escenario de Parkinson y Parkinson + cafeína. Sin embargo, en comparación con el escenario saludable y saludable + cafeína, se puede observar que entre estos escenarios existe una variación de los flujos de estas dos reacciones. DOPAt4_2_r (9,3 $\mu M \cdot h^{-1}$ a 37,6 $\mu M \cdot h^{-1}$), DOPAtu (16 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -12 $\mu M \cdot h^{-1}$). En cuanto a los escenarios saludable [9,3 $\mu M \cdot h^{-1}$] y Parkinson [-7,43 $\mu M \cdot h^{-1}$], en la reacción DOPAt4_2_r hubo una pérdida de aproximadamente 80% de dopamina, y en cuanto a los escenarios de saludable + cafeína [37,6 $\mu M \cdot h^{-1}$] y Parkinson + cafeína [-7,43 $\mu M \cdot h^{-1}$], hubo una pérdida de aproximadamente 20% de dopamina. En su conjunto, estos resultados son congruentes con los resultados de algunos autores en la literatura en donde se reporta que los síntomas de la EP no se desarrollan hasta que cerca del 80-85% del contenido de dopamina se agota (García, 2008; Wirdefeldt *et al.,* 2011).

Los flujos de las reacciones EX_ala_L(e) (-1 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1 $\mu M \cdot h^{-1}$), EX_arg_L(e) (-1 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1 $\mu M \cdot h^{-1}$), EX_asn_L(e) (-1 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1 $\mu M \cdot h^{-1}$), EX_gln_L(e) (-1 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1 $\mu M \cdot h^{-1}$), EX_pro_L(e) (-1 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1 $\mu M \cdot h^{-1}$), EX_ser_L(e) (-1 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1 $\mu M \cdot h^{-1}$), EX_val_L(e) (-1 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1 $\mu M \cdot h^{-1}$), permanecieron constantes en neurona Parkinson y Parkinson +

cafeína, lo que indica que la entrada de cafeína al sistema no tiene un efecto negativo en estos aminoácidos. Hecho importante de destacar ya que estos aminoácidos componen en un 35% la función objetivo de mantenimiento celular.

También se evalúo la variación de flujo de las reacciones de cafeína tanto para el modelo saludable + cafeína como para el modelo Parkinson + cafeína. En la figura 12, se observa que en la reacción "Caffeine6", que es la conversión de 1,7-dimetilxantina a 1,7-dimetilmurato, hay un mayor valor de flujo (22 $\mu M \cdot h^{-1}$ a 21,3 $\mu M \cdot h^{-1}$) para el modelo de neurona saludable + cafeína, todo lo contrario, para la reacción "Caffeine3", que es la conversión de 1,7-dimetilxantina a 1,7-dimetilmurato en presencia de O_2 y H_2O, se presentó un valor de flujo mayor (4,4 $\mu M \cdot h^{-1}$ a 5 $\mu M \cdot h^{-1}$) para el modelo de neurona Parkinson más cafeína.

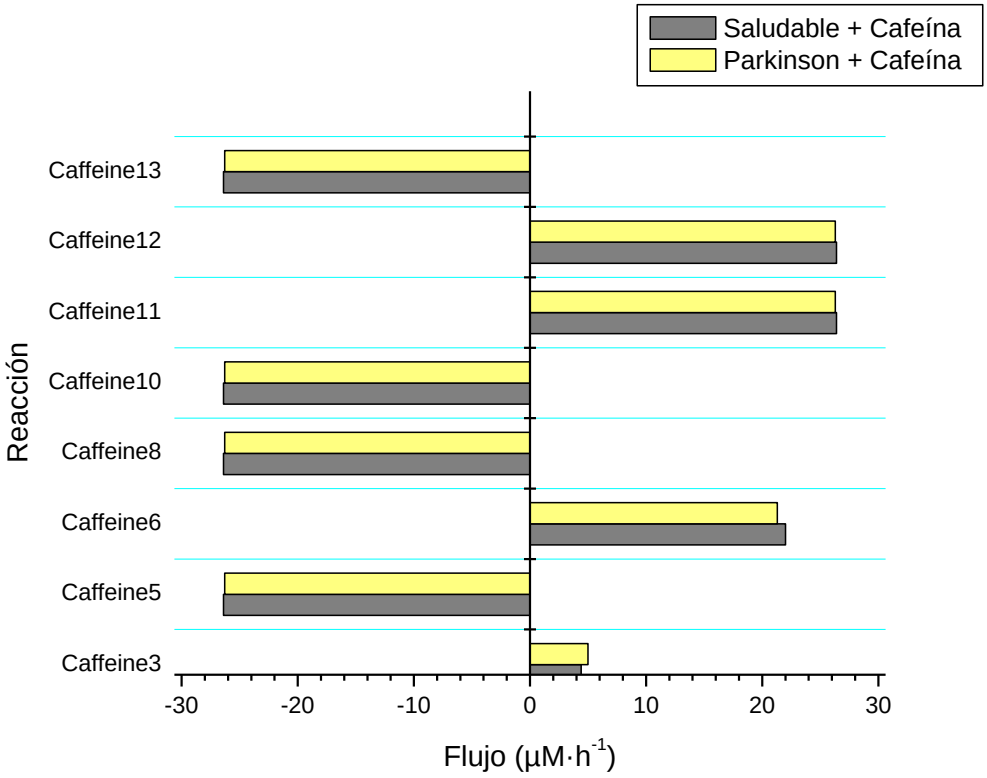


Figura 15. Variaciones de flujo en las reacciones de cafeína tanto para el modelo saludable + cafeína como para el modelo Parkinson + cafeína.

Cabe resaltar que la figura 15 no muestra información de flujos de las reacciones Caffeine1, Caffeine2, Caffeine4, Caffeine7 y Caffeine9, debido a que obtuvieron flujos

muy cercanos a cero (0 μM·h^{-1} a -3e-28 μM·h^{-1}). Sin embargo, esto no significa que no sean reacciones relevantes, ya que estas reacciones están involucradas en la entrada de cafeína del medio extracelular (Caffeine1), la entrada de cafeína del medio extracelular al medio citoplasmático (Caffeine2), la conversión de 1-metilxantina a ácido 1-metilúrico (Caffeine4), la conversión de cafeína a 1,7-dimetilxantina (Caffeine7) y la conversión de ácido 1-metilúrico en urato.

Finalmente y con el fin de observar diferencias o semejanzas en el fenotipo metabólico encontrado en la neurona saludable y la neurona Parkinson más cafeína (Figura 16), se compararon los flujos de las reacciones de importancia metabólica y así poder visualizar la presencia o ausencia de un efecto neuroprotector de la cafeína en la EP. Esto debido a que la neurona saludable es el control negativo de los experimentos y la neurona Parkinson + cafeína es el control positivo

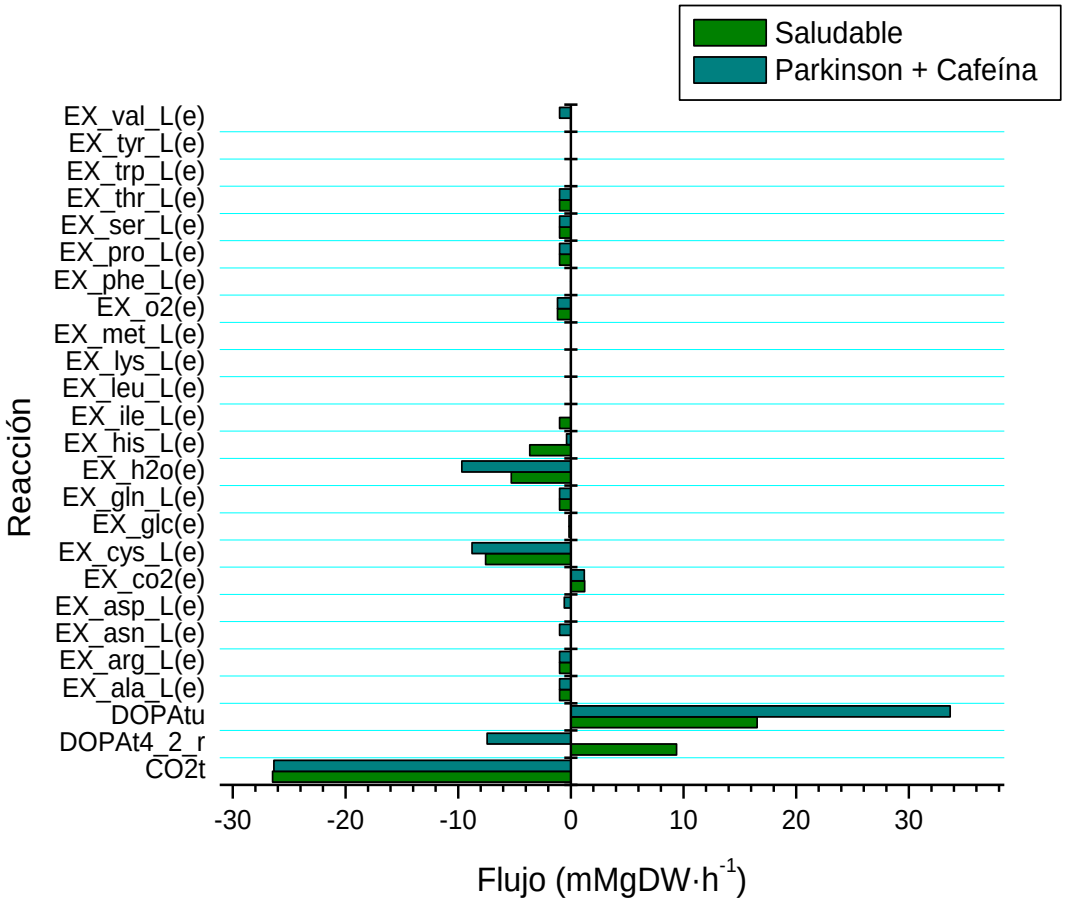


Figura 16. Cambios en reacciones de importancia metabólica en los modelos saludable y Parkinson + cafeína.

En la figura 16 se puede evidenciar, que entre ambas simulaciones se comparten flujos específicos, sin presentar diferencia alguna, es decir, para la reacción CO2t tiene un flujo de -26.471 $\mu M \cdot h^{-1}$ tanto para la neurona saludable como para la neurona Parkinson + cafeína, al igual que para las reacciones de EX_ala_L(e), EX_arg_L(e), EX_gln_L(e), EX_thr_L(e), EX_ser_L(e) y EX_pro_L(e), quienes tienen un flujo de -1 $\mu M \cdot h^{-1}$ y la reacción EX_o2(e), quien tienen un flujo de -1.193 $\mu M \cdot h^{-1}$ en ambas simulaciones.
Esto quiere decir, que es probable observar el efecto neuroprotector de la cafeína en la EP, ya que el fenotipo metabólico encontrado en la neurona Parkinson + cafeína no difiere a grandes rasgos de la neurona saludable. Afirmando las hipótesis descritas por varios autores, quienes plantean que el consumo prolongado de dosis moderadas de cafeína disminuye el riesgo de padecer la EP (Ross *et al.,* 2000; Ascherio *et al.,* 2001; Hernán *et al.,* 2002; Ascherio *et al.,* 2003; Ascherio *et al.,* 2004; Hue *et al.,* 2007; Sääksjärvi *et al.,* 2008).

4.3.1 Influencia de las reacciones sobre la función objetivo

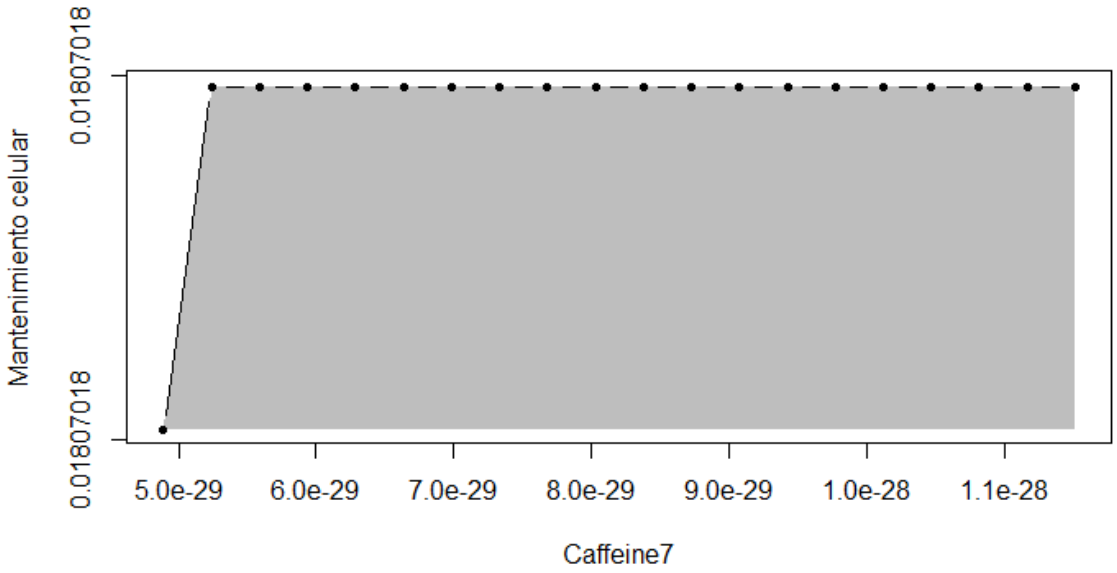


Figura 17. Análisis de robustez entre la función objetivo de mantenimiento celular y cafeína en el modelo de neurona Parkinson + cafeína.

Con el fin de predecir el comportamiento de la célula dopaminérgica frente a un escenario de cambio de concentración de cafeína en el sistema, se realizó un análisis de robustez manteniendo la función objetivo principal del modelo (mantenimiento celular), para observar su alteración con la entrada de cafeína. En la figura 17 se observa que al inicio de la simulación se encuentran ambas variables en el flujo mínimo, pero luego a medida que la cafeína aumenta el flujo, la función objetivo de mantenimiento celular no se ve afectada, ni varía. Esto podría indicar que en términos generales la cafeína no tiene un efecto significativo en el mantenimiento celular de la neurona. Ya que, a pesar de la variación en los flujos de los metabolitos esenciales que componen la función objetivo, estos no se dejan de producir incluso cuando hay presencia de cafeína, por lo que la neurona no se ve afectada de manera negativa con la presencia de esta sustancia.

Adicionalmente, se realizó un análisis de robustez teniendo como función objetivo la entrada de tirosina extracelular (EX_tyr_L(e)), para observar la alteración de los niveles de tirosina con la entrada de cafeína al sistema. Lo que se puede observar en la figura 18, es que al inicio de la simulación se encuentra en el flujo mínimo la variable de cafeína, pero luego a medida que la cafeína aumenta el flujo, la función objetivo de tirosina extracelular alcanza al inicio de la simulación su flujo máximo de 0.0132 $\mu M \cdot h^{-1}$ y luego permanece constante mientras la cafeína aumenta su flujo hasta 1.1e-28 $\mu M \cdot h^{-1}$.

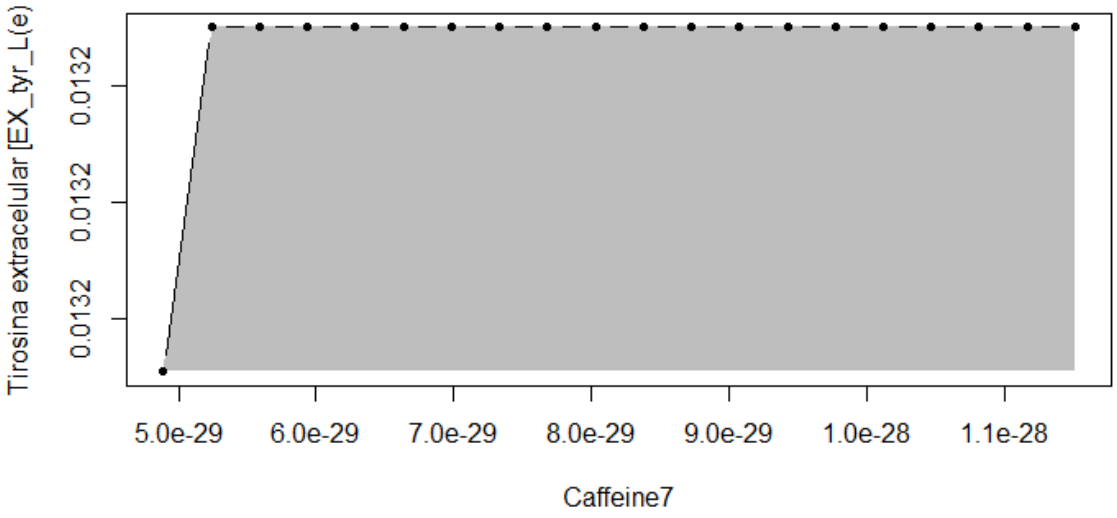


Figura 18. Análisis de robustez entre la entrada de tirosina extracelular y cafeína en el modelo de neurona Parkinson + cafeína.

Esto podría indicar, al igual que la anterior simulación que los niveles de tirosina extracelular no se ven afectados por la entrada de cafeína al sistema, aunque algunos autores han encontrado que la cafeína puede incrementar los niveles de tirosina y por ende los niveles de dopamina en el cerebro (Tanaka & Nakazawa, 1990), en esta simulación no se observa esta variación, tal vez debido a que la disponibilidad de tirosina extracelular esta mediada más por la dieta (Matthews , 2007; Young, 2007), así como por las características de la microbiota intestinal (Blaut & Clavel, 2007; Davila *et al.,* 2013), variables que no son tenidas en cuenta en el modelo desarrollado.

4.4 Identificación de mecanismos moleculares de neuroprotección

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, se puede inferir que es probable que la cafeína proteja a la neurona de la pérdida de metabolitos esenciales para su funcionamiento y subsistencia. Esto quiere decir, que a pesar de que se presentan variaciones en aminoácidos importantes para el mantenimiento celular de la neurona, esta no se ve afectada en ninguna simulación, incluso con la entrada de cafeína al sistema, es

decir, que a pesar de que la neurona presente enfermedad de Parkinson, no hay perdida de funciones vitales para la neurona que desencadenen en procesos apoptóticos.

Adicionalmente, se ha reportado un efecto neuroprotector de la cafeína en cuanto a la pérdida de dopamina y al aumento de tirosina extracelular, las simulaciones realizadas en este trabajo no muestran evidencias de aumento de tirosina extracelular, pero si evidencia aumento en el transporte vía sodio de dopamina en la simulación saludable + cafeína y en el transporte del medio extracelular al medio citoplasmático, en la simulación de Parkinson + cafeína. Aunque se presentaron pérdidas en los niveles de dopamina, estos se atribuyen a la simulación de la enfermedad y no a la entrada de cafeína al sistema. Por lo tanto, esto quiere decir, que las simulaciones llevadas a cabo en este trabajo apoyan las hipótesis del efecto neuroprotector de la cafeína frente a la enfermedad de Parkinson, ya que, aunque se presenten pérdidas de dopamina, esta no se pierde por completo en el sistema y por el contrario cuando hay cafeína, los niveles de dopamina aumentan.

5. Conclusiones

Se obtuvo un modelo de neurona dopaminérgica con un total de 2015 reacciones, 1474 metabolitos y 943 genes asociados. El modelo computacional adicionalmente cuenta con 8 compartimentos, dentro de los cuales se encuentran citoplasma [c], mitocondria [m], extracelular [e], lisosoma [l], nuclear [n], retículo endoplasmático [r], aparato de Golgi [g] y peroxisoma [p].

En total 13 reacciones de metabolismo de cafeína, fueron incluidas en el modelo computacional, dentro de las cuales se encuentran reacciones de transporte Caffeine1 y Caffeine2, reacciones que van a vías metabólicas de las Xantinas, como Caffeine3, Caffeine4, Caffeine5, Caffeine6, Caffeine7, Caffeine8, Caffeine12 y Caffeine13. Y finalmente, reacciones pertenecientes a las vías del ácido úrico, como Caffeine9, Caffeine10 y Caffeine11.

Respecto a la simulación de neurona saludable y neurona saludable + cafeína, se obtuvo que el cambio más relevante fue el aumento del flujo en la reacción DOPAt4_2_r (9,3 $\mu M \cdot h^{-1}$ a 37,6 $\mu M \cdot h^{-1}$), un flujo cercano a cero para las reacciones de EX_tyr_L(e), EX_trp_L(e), EX_phe_L(e), EX_met_L(e), EX_lys_L(e). Un flujo constante para la reacción EX_o2(e) (-1,19 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1,19 $\mu M \cdot h^{-1}$), una disminución del flujo en la reacción CO2t (-26,3 $\mu M \cdot h^{-1}$ a 16 $\mu M \cdot h^{-1}$) y un aumento en la reacción EX_h2o(e) (-6 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -8 $\mu M \cdot h^{-1}$).

Respecto a la simulación de neurona Parkinson y Parkinson + cafeína se obtuvo una disminución de la reacción EX_h2o(e) (-14 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -10 $\mu M \cdot h^{-1}$), flujo constante para la reacción EX_o2(e) (-1,19 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1,19 $\mu M \cdot h^{-1}$), se presentaron variaciones en el flujo de la reacción DOPAt4_2_r (-7,43 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -7,43 $\mu M \cdot h^{-1}$) y en la reacción DOPAtu (33,6 $\mu M \cdot h^{-1}$ a 33, 6 $\mu M \cdot h^{-1}$), con respecto a la simulación de neurona saludable y neurona saludable + cafeína. Y Finalmente, flujos constantes para las reacciones EX_ala_L(e) (-1 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1 $\mu M \cdot h^{-1}$), EX_arg_L(e) (-1 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1 $\mu M \cdot h^{-1}$), EX_asn_L(e) (-1 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1 $\mu M \cdot h^{-1}$), EX_gln_L(e) (-1 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1 $\mu M \cdot h^{-1}$), EX_pro_L(e) (-1 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1 $\mu M \cdot h^{-1}$), EX_ser_L(e) (-1 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1 $\mu M \cdot h^{-1}$), EX_val_L(e) (-1 $\mu M \cdot h^{-1}$ a -1 $\mu M \cdot h^{-1}$).

La cafeína no muestra efectos negativos en el mantenimiento celular de la neurona, y por ende no hay ni muerte celular, ni deficiencia en su metabolismo, por lo que la neurona no se ve afectada de manera negativa con la presencia de esta sustancia.

Los niveles de tirosina extracelular no se ven afectados por la entrada de cafeína al sistema, debido probablemente a los bajos niveles de tirosina en el sistema debido a la pérdida de dopamina, resultante de la simulación de la enfermedad de Parkinson, así como a las características del modelo, en el cual la dieta y/o la microbiota intestinal no son tenidas en cuenta como fuente de tirosina extracelular.

Se infiere que la cafeína protege a la neurona de la pérdida de producción y liberación de metabolitos esenciales para su funcionamiento y subsistencia, a pesar de que la neurona presente enfermedad de Parkinson, no hay perdida de funciones vitales para la neurona que desencadenen en procesos apoptóticos.

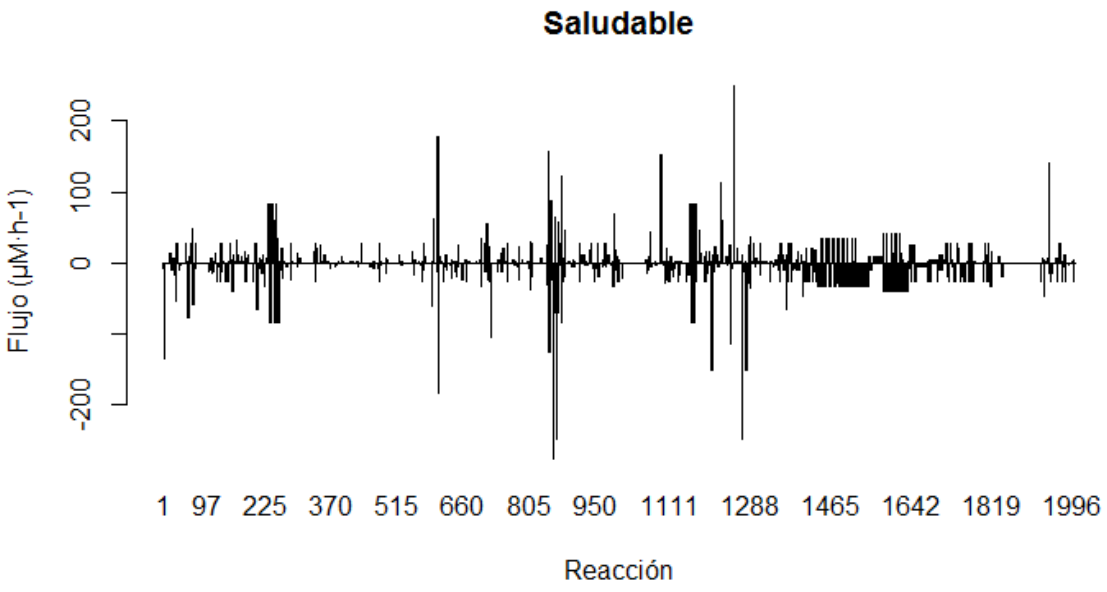
Las simulaciones realizadas en este trabajo no muestran evidencias de aumento de tirosina extracelular, al contrario, evidencia aumento en el transporte vía sodio de dopamina en la simulación saludable + cafeína y en el transporte del medio extracelular al medio citoplasmático, en la simulación de Parkinson + cafeína.

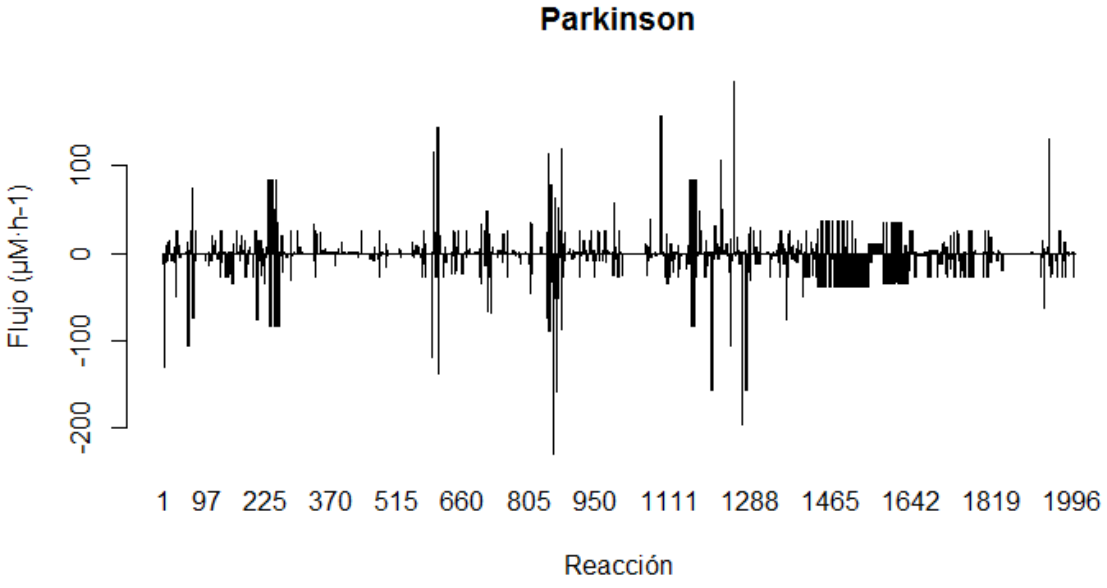
6. Recomendaciones

Se recomienda realizar los ensayos experimentales pertinentes para la validación del modelo computacional.

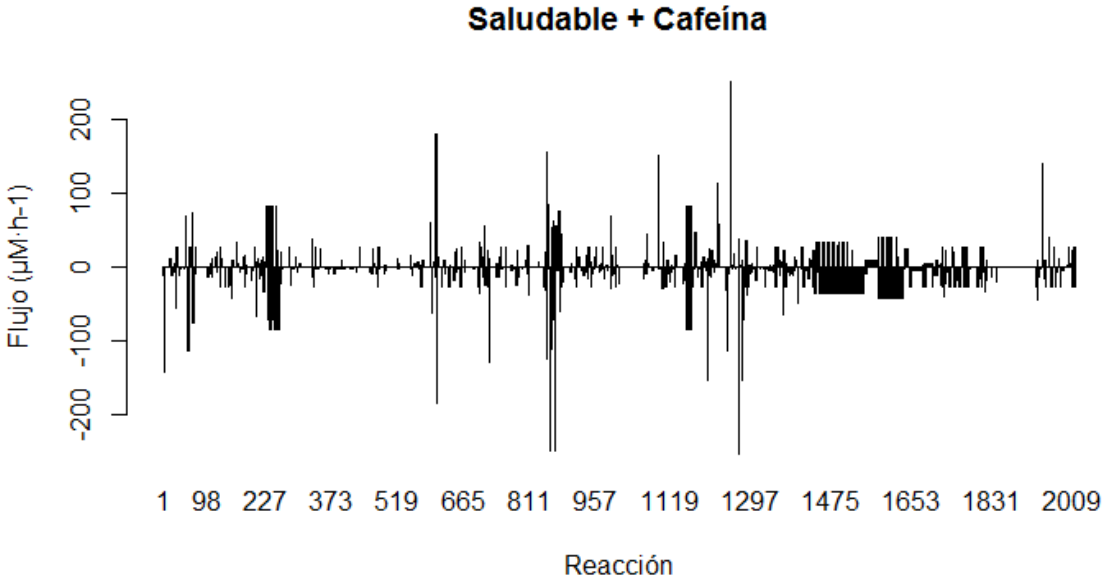
7. Anexos

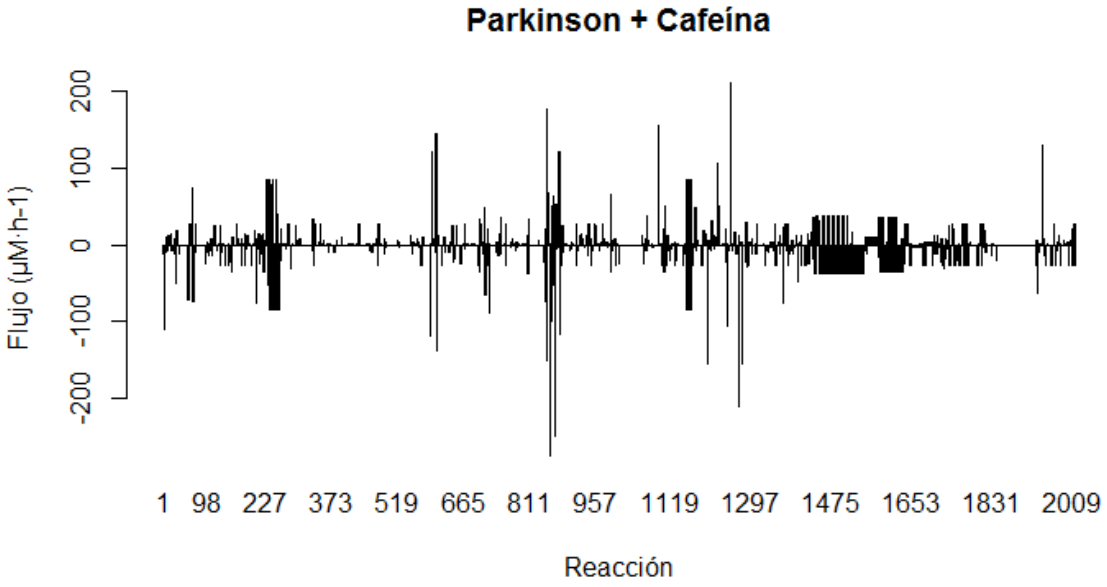
ANEXO 1. Distribución de flujos de los modelos neurona saludable y neurona Parkinson.



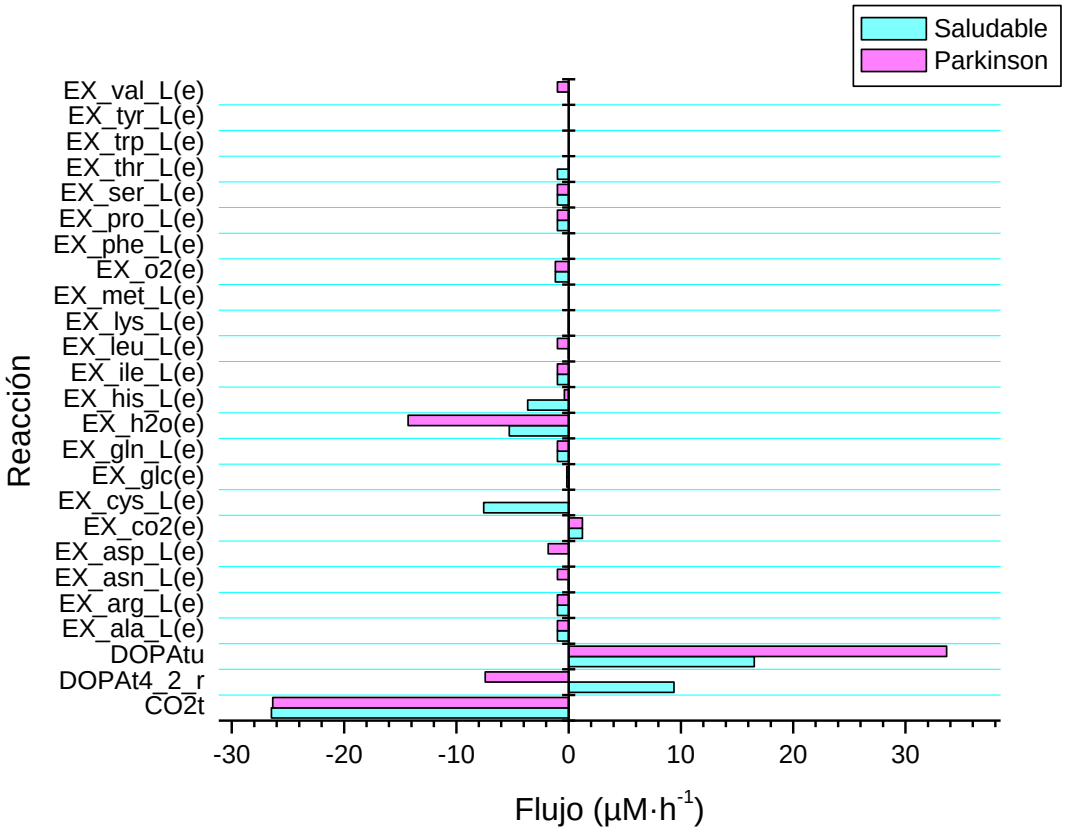


ANEXO 2. Distribución de flujos de los modelos saludable + cafeína y Parkinson + cafeína.

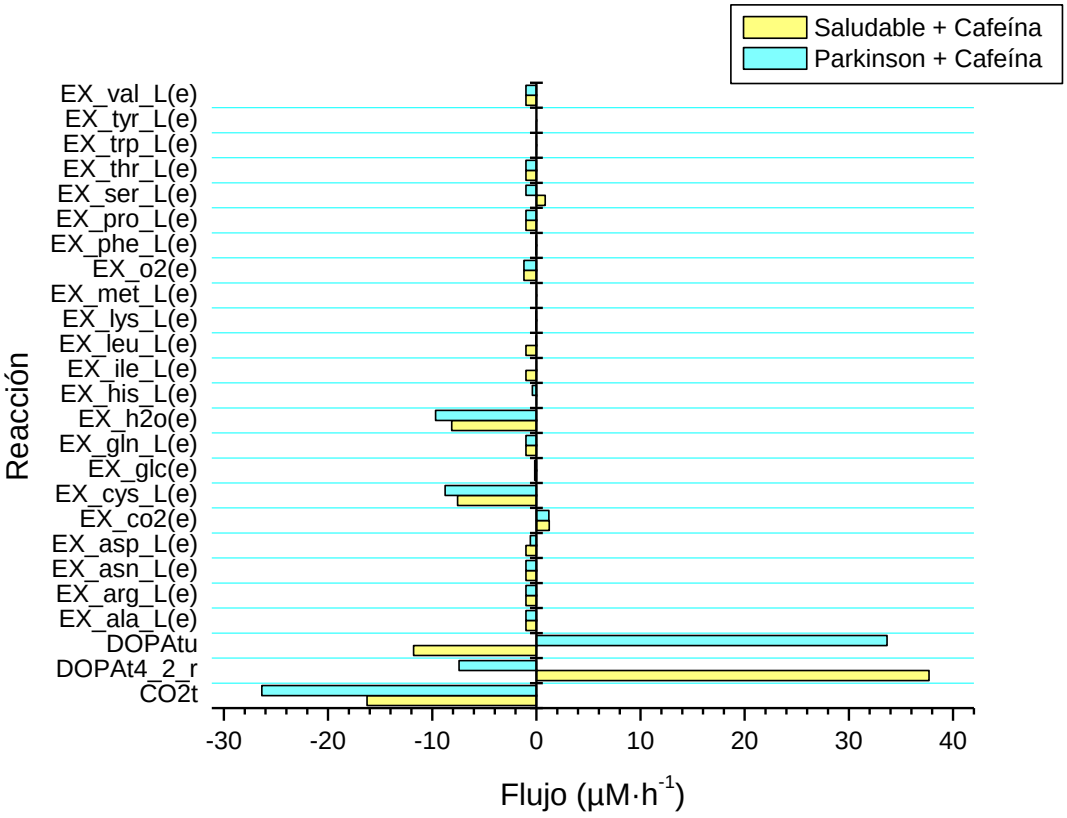




ANEXO 3. Flujos control de los modelos saludable y Parkinson.



ANEXO 4. Efecto a nivel metabólico de la cafeína en los modelos saludable + cafeína y Parkinson + cafeína.



8. Bibliografía

AOYAMA, S. ; KASE, H. ; BORRELLI, E.: Rescue of locomotor impairment in dopamine D2 receptor-deficient mice by an adenosine A2A receptor antagonist. En: *Journal of Neuroscience,* 2000, 20: 5848-5852

ASCHERIO, A. ; CHEN, H. ; SCHWARZSCHILD, M. ; ZHANG, S. ; COLDITZ, G. ; SPEIZER, F.: Caffeine, postmenopausal estrogen, and risk of Parkinson's disease. En: *Neurology*, 2003, 60: 790-795

ASCHERIO, A. ; WEISSKOPF, M. ; O'REILLY, E. ; MCCULLOUGH, M. ; CALLE, E. ; RODRÍGUEZ, C. ; THUN, M.: Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. En: *American Journal of Epidemiology*, 2004, 160: 977-984

ASCHERIO, A. ; ZHANG, S. ; HERNÁN, M. ; KAWACHI, I. ; COLDITZ, G. ; SPEIZER, F. ; WILLETT, W.: Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. En: *Annals of Neurology,* 2001, 50(1): 56-63

BARRETT, C. ; HERRING, C. ; REED, J. ; PALSSON, B.: The global transcriptional regulatory network for metabolism in Escherichia coli exhibits few dominant functional states. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 2005, 102: 19103–19108

BEGAS, E. ; KOUVARAS, E. ; TSAKALOF, A. ; PAPAKOSTA, S. ; ASPRODINI, E.: In vivo evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios. En: *Biomedical chromatography,* 2007, 21(2): 190-200

BENEDETTI, M. ; BOWER, J. ; MARAGANORE, D. ; MCDONNELL, S. ; PETERSON, B. ; AHLSKOG, J. ; SCHAID, D. ; ROCCA, W.: Smoking, alcohol, and coffee consumption preceding Parkinson's disease: a case-control study. En: *Neurology,* 2000, 55(9): 1350-1358

BENOWITZ, N. ; JACOB, P. ; MAYAN, H. ; DENARO, C.: Sympathomimetic effects of paraxanthine and caffeine in humans. En: *Clinical Pharmacology and Therapeutics,* 1995, 58(6): 684-691

BERTHOU, F. ; FLINOIS, J. ; RATANASAVANH, D. ; BEAUNE, P. ; RICHE, C. ; GUILLOUZO, A.: Evidence for the involvement of several cytochromes P-450 in the first steps of caffeine metabolism by human liver microsomes. En: *Drug Metabolism and Disposition,* 1991, 19(3): 561-567

BLAUT, M. ; CLAVEL, T.: Metabolic Diversity of the Intestinal Microbiota: Implications for Health and Disease. En: *Journal of Nutrition,* 2007, 137(3): 751-755

BRIVA, A. ; LECUONA, E. ; SZNAJDER, J.: Permissive and Non-permissive Hypercapnia: Mechanisms of Action and Consequences of High Carbon Dioxide Levels. En: *Archivos de Bronconeumología*, 2010, 46(7): 378-382

BURCH, D. ; SHEERIN, F.: Parkinson' disease. En: *Lancet,* 2005, 365(9459): 622-627

BUSHELL, M. ; SEQUEIRA, S. ; KHANNAPHO, C. ; ZHAO, H. ; CHATER, K. ; BUTLER, M. ; KIERZEK, A. ; AVIGNONE-ROSSA, C.: The use of genome scale metabolic flux variability analysis for process feed formulation based on an investigation of the effects of the zwf mutation on antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. En: *Enzyme and Microbial Technology,* 2006, 39(6): 1347–1353

CALLAHAN, M. ; ROBERTSON, R. ; ARNAUD, M. ; BRANFMAN, A. ; MCCOMISH, M. ; YESAIR, D.: Human metabolism of [1-methyl-14C]- and [2-14C] caffeine after oral administration. En: *Drug Metabolism and Disposition,* 1982, 10(4): 417-423

CHAVALI, A. ; WHITTEMORE, J. ; EDDY, J. ; WILLIAMS, K. ; PAPIN, J.: Systems analysis of metabolism in the pathogenic trypanosomatid *Leishmania major*. En: *Molecular Systems Biology*, 2008, 4: 177

CHEN, J. ; BEILSTEIN, M. ; XU, Y. ; TURNER, T. ; MORATALLA, R. ; STANDAERT, D. ; ALOYO, V. ; FINK, J. ; SCHWARZSCHILD, M.: Selective attenuation of psychostimulant-induced behavioral responses in mice lacking A(2A) adenosine receptors. En: *Neuroscience,* 2000, 97: 195-204

CHEN, H. ; JACOBS, E. ; SCHWARZSCHILD, M. ; MCCULLOUGH, M. ; CALLE, E. , THUN, M. ; ASCHERIO, A.: Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. En: *Annals of Neurology,* 2005, 58(6): 963-967

CHEN, J. ; MORATALLA, R. ; IMPAGNATIELLO, F. ; GRANDY, D. ; CUELLAR, B. ; RUBINSTEIN, M. ; BEILSTEIN, M. ; HACKETT, E. ; FINK, J. ; LOW, M. ; ONGINI, E. ; SCHWARZSCHILD, M.: The role of the D(2) dopamine receptor (D(2)R) in A(2A) adenosine receptor (A(2A)R)-mediated behavioral and cellular responses as revealed by A(2A) and D(2) receptor knockout mice. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98: 1970-1975

CHEN, H. ; ZHANG, S. ; HERNÁN, M. ; SCHWARZSCHILD, M. ; WILLETT, W. ; COLDITZ, G. ; SPEIZER, F. ; ASCHERIO, A.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. En: *Archives of Neurology*, 2003, 60: 1059–1064

CHOUZA, M. ; RAPOSO, I. ; FERNÁNDEZ, R. ; GONZÁLEZ, L. ; MARTÍNEZ, A. ; FERNÁNDEZ, M.: Protocolo de Fisioterapia en el paciente parkinsoniano. En: *Fisioterapia,* 2001, 23(4): 191-199

CLARIA, J. ; SERHAN, C. : Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92: 9475–9479

ÇAKIR, T. ; ALSAN, S. ; SAYBAŞILI, H. ; AKIN, A. ; ULGEN, K.: Reconstruction and flux analysis of coupling between metabolic pathways of astrocytes and neurons: application to cerebral hypoxia. En: *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 2007, 4: 48

DAGER, S. ; LAYTON, M. ; STRAUSS, W. ; RICHARDS, T. ; HEIDE, A. ; FRIEDMAN, S. ; ARTRU, A. ; HAYES, C. ; POSSE, S.: Human brain metabolic response to caffeine and the effects of tolerance. En: *American Journal of Psychiatry,* 1999, 156(2): 229-237

DALY, J.: Caffeine analogs: biomedical impact. En: *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, 64: 2153-2169

DALY, J. ; FREDHOLM, B.: An atypical drug of dependence. En: *Drug and Alcohol Dependence*, 1998, 51: 199–206

DAVILA, A. ; BLACHIER, F. ; GOTTELAND M. ; ANDRIAMIHAJA, M. ; BENETTI, P. ; SANZ, Y. ; TOMÉ, D.: Re-print of “Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host”. En: *Pharmacological Research,* 2013, 69: 114–126

DE LAU, L. ; GIESBERGEN, P. ; DE RIJK, M. ; HOFMAN, A. ; KOUDSTAAL, P. ; BRETELER, M.: Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study. En: *Neurology,* 2004, 63(7): 1240-1244

DEXTER, D.: Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. En: *Journal of Neurochemistry,* 1989, 52: 381-389

DIAS, O. ; ROCHA, M. ; FERREIRA, E. ; ROCHA, I.: Reconstructing genome-scale metabolic models with merlin. En: *Nucleic Acids Research,* 2015, 1-12

DI MATTEO, V. ; PIERUCCI, M. ; DI GIOVANNI, G. ; DI SANTO, A. ; POGGI, A. ; BENIGNO, A. ; ESPOSITO, E.: Aspirin protects striatal dopaminergic neurons from neurotoxin-induced degeneration: An in vivo microdialysis study. En: *Brain Research*, 2006, 1095: 167–177

DORN, H.: Tobacco consumption and mortality from cancer and other diseases. En: *Public Health Reports*, 1959, 74: 581-93

ELLIOTT, J. ; BEVERIDGE, T.: Psychostimulants and monoamine transporters: upsetting the balance. En: *Current Opinion in Pharmacology*, 2005, 5: 94-100

FAHN, S.: Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease? En: *Journal of Neurology,* 2005, 252(4): 37–42

FEDERACIÓN DE CAFETEROS.: Al Grano, Noticias e información que lo acercan al mundo cafetero. En: https://www.federaciondecafeteros.org/algrano-fnc-es/index.php/comments/en_cinco_anos_el_consumo_interno_de_cafe_crecio_33.

FEIST, A. ; ZIELINSKI, D. ; ORTH, J. ; SCHELLENBERGER, J. ; HERRGARD, M. ; PALSSON, B.: Model-driven evaluation of the production potential for growth-coupled products of *Escherichia coli*. En: *Metabolic Engineering*, 2009, 12: 173–186

FERRÉ, S.: An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. En: *Journal of Neurochemistry*, 2008, 105: 1067-1079

FERRÉ, S.: La cafeína en la enfermedad de Parkinson. En: *Medicina Clínica*, 2008a, 131(18): 710-715

FERRÉ, S. ; AGNATI, L. ; CIRUELA, F. ; LLUIS, C. ; WOODS, A. ; FUXE, K. ; FRANCA, R.: Neurotransmitter receptor heteromers and their integrative role in «local modules»: the striatal spine module. En: *Brain Research Reviews*, 2007, 55: 55-67

FERRÉ, S. ; FREDHOLM, B. ; MORELLI, M. ; POPOLI, P. ; FUXE, K.: Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. En: *Trends Neurosciences*, 1997, 20: 482-487

FERRÉ, S. ; FUXE, K. ; VON EULER, G. ; JOHANSSON, B. ; FREDHOLM, B.: Adenosine dopamine interactions in the brain. En: *Neuroscience*, 1992, 51: 501-512

FERRÉ, S. ; HERRERA, M. ; GRABOWSKA, M. ; CASAS, M. ; UNGERSTEDT, U. ; ANDEN, N.: Postsynaptic dopamine/adenosine interaction: II. Postsynaptic dopamine agonism and adenosine antagonism of methylxanthines in short-term reserpinized mice. En: *European Journal of Pharmacology*, 1991, 192: 31-37

FLOOR, E. ; WETZEL, M.: Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. En: *Journal of Neurochemistry*, 1998, 70: 2682-2675

FREDHOLM, B. ; BATTIG, K. ; HOLMEN, J. ; NEHLIG, A. ; ZVARTAU, E.: Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. En: *Pharmacological Reviews*, 1999, 51: 83-133

GAGNE, J. ; POWER, M.: Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease. En: *Neurology*, 2010, 74: 995-1002

GARCÍA, S. ; SAURI, S. ; MEZA, D. ; LUCINA, C.: Perspectiva histórica y aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Parkinson. En: *Medicina Interna Mexicana,* 2008, 21(1): 28-37

GARRETT, B. ; GRIFFITHS, R.: The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. En: *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1997, 57: 533-541

GASTEIGER, E. ; GATTIKER, A. ; HOOGLAND, C. ; IVANYI, I. ; APPEL, R. ; BAIROCH, A.: ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. En: *Nucleic Acids Research*, 2003, 31: 3784–3788

GENTRY, C. ; LUKAS, R.: Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure. En: *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 2002, 1: 359–385

GERFEN, C.: Basal ganglia. En: Paxinos G, editor. The rat nervous system. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004, p. 445-508

GINSBURG, H.: Caveat emptor: limitations of the automated reconstruction of metabolic pathways in *Plasmodium*. En: *Trends in Parasitology*, 2009, 25: 37-43

GOLDSTEIN, J. ; SILBERSTEIN, S. ; SAPER, J. ; RYAN, R. ; LIPTON, R.: Acetaminophen, aspirin and caffeine in combination versus ibuprofen for acute migraine: results from a multicenter, double- blind, randomized, parallel-group, single-dose, placebo-controlled study. En: *Headache,* 2006, 46:444-453

GÓMEZ, M. ; ROLDAN, G. ; ESPINOSA, R. ; SOTO, G. ; AGUILAR, C.: Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson. En: *Archivos de Neurociencias,* 2012, 17(1): 25-33

GONZALEZ, O. ; GRONAU, S. ; FALB, M. ; PFEIFFER, F. ; MENDOZA, E. ; ZIMMER, R. ; OESTERHELT, D.: Reconstruction, modeling & analysis of *Halobacterium salinarum* R-1 metabolism. En: *Molecular BioSystems*, 2008, 4: 148–159

GRAHAM, D.: Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. En: *Molecular Pharmacology*, 1978, 14: 633-43

GRIFFITHS, R. ; JULIANO, L. ; CHAUSMER, A.: Caffeine: pharmacology and clinical effects. En: Graham AW, Schultz TK, Mayo-Smith MF, Ries RK, Wilford BB, editors. Principles of addiction medicine. 3rd ed. Chevy Chase: American Society of Addiction Medicine, 2003, p. 193-224

GUARENTE, L.: Synthetic enhancement in gene interaction: a genetic tool come of age. En: *Trends in Genetics*, 1993, 9: 362–366

GUDMUNDSSON, S. ; THIELE, I.: Computationally efficient flux variability analysis. En: *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 489

HALLIWELL, B.: Reactive oxygen species and the central nervous system. En: *Journal of Neurochemistry*, 1992, 59: 1609-1623

HENRY, C. ; DEJONGH, M. ; BEST, A. ; FRYBARGER, P. ; LINSAY, B. ; STEVENS, R.: High-throughput Generation and Optimization of Genome-scale Metabolic Models. En: *Nature Biotechnology*, 2010, 28(9): 977-982

HERNÁN, M. ; LOGROSCINO, G. ; GARCÍA, L.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of Parkinson disease. En: *Neurology*, 2006, 66: 1097–1099

HERNÁN, M. ; TAKKOUCHE, B. ; CAAMAÑO, F. ; GESTAL, J.: A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. En: *Annals of Neurology*, 2002, 52(3): 276-284

HERNÁNDEZ, H.: Aspectos moleculares y prospectos de terapias en la enfermedad de Parkinson. En: *Bioquímica,* 2006, 31(4): 146-158

HIMMELBLAU, D. ; RIGGS, J.: Basic Principles and Calculations in Chemical Engineering, 8th Edition, Prentice Hall, Pp 59-62, 2012

HIRSCH, E. ; HUNOT, S.: Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?. En: *Lancet Neurology*, 2009, 8: 382–397

HODAIE, M. ; NEIMAT, J. ; LOZANO, A.: The dopaminergic nigrostriatal system and Parkinson's disease: molecular events in development, disease, and cell death, and new therapeutic strategies. En: *Neurosurgery,* 2007, 60: 17–28

HONG, D. ; FINK, A. ; UVERSKY, V.: Smoking and Parkinson's disease: does nicotine affect a-synuclein fibrillation?. En: *Biochimica et Biophysica Acta,* 2009, 1794: 282–290

HU, G. ; BIDEL, S. ; JOUSILAHTI, P. ; ANTIKAINEN, R. ; TUOMILEHTO, J.: Coffee and tea consumption and the risk of Parkinson's disease. En: *Movement Disorders*, 2007, 22: 2242-2248

HUNOT, S. ; HIRSCH, E.: Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. En: *Annals of Neurology*, 2003, 53(3): 49 –58

IKEDA, K. ; KUROKAWA, M. ; AOYAMA, S. ; KUWANA, Y.: Neuroprotection by adenosine A2A receptor blockade in experimental models of Parkinson's disease. En: *Journal of Neurochemistry*, 2002, 80: 262-270

INFANTE, C. ; MORA, L. ; ORTEGA, J. ; ARBOLEDA, C. ; FERNÁNDEZ, W. ; ARBOLEDA, H. , ARBOLEDA, G.: Análisis de mutaciones en los genes PINK1 Y PARKIN en pacientes colombianos con enfermedad de Parkinson. En: *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 2014, 12(21): 15-21

IVANOVA, A. ; LYKIDIS, A.: Metabolic Reconstruction. En: *Encyclopedia of Microbiology*, 3rd Edition: 607-621, 2009

JENNER, P.: Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. En: *Movement Disorders*, 1998, 13(1): 24-34

KALOW, W. ; TANG, B.: The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal. En: *Clinical Pharmacology and Therapeutics,* 1993, 53(5): 503-514

KANEHISA, M. ; GOTO, S.: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. En: *Nucleic Acids Research*, 2000, 28: 27-30

KANEHISA, M. ; GOTO, S. ; HATTORI, M. ; AOKI-KINOSHITA, K. ; ITOH, M. ; KAWASHIMA, S. ; KATAYAMA, T. ; ARAKI, M. ; HIRAKAWA, M.: From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. En: *Nucleic Acids Research*, 2006, 34: 354–357

KANEHISA, M. ; SATO, Y. ; KAWASHIMA, M. ; FURUMICHI, M. ; TANABE, M.: KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. En: *Nucleic Acids Research,* 2016, 44: 457-462

KARP, P. ; PALEY, S. ; ROMERO, P.: The Pathway Tools Software. En: *Bioinformatics*, 2002, 18(1): 225-232

KIM, P. ; LEE, D. ; KIM, T. ; LEE, K. ; JEONG, H. ; LEE, S. ; PARK, S.: Metabolite essentiality elucidates robustness of *Escherichia coli* metabolism. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104: 13638–13642

KIM, D. ; PALMITER, R.: Adenosine receptor blockade reverses hypophagia and enhances locomotor activity of dopamine-deficient mice. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100: 1346-1351

KOT, M. ; DANIEL, W.: Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. En: *Pharmacological Reports,* 2008, 60(6): 789-797

KOT, M. ; DANIEL, W.: The relative contribution of human cytochrome P450 isoforms to the four caffeine oxidation pathways: an in vitro comparative study with cDNA-expressed P450s including CYP2C isoforms. En: *Biochemical Pharmacology,* 2008a, 76(4): 543-551

KUMAR, A. ; SUTHERS, P. ; MARANAS, C.: MetRxn: a knowledgebase of metabolites and reactions spanning metabolic models and databases. En: *BMC Bioinformatics,* 2012, 13: 6

LANG ,A. ; OBESO, J.: Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. En: *Lancet Neurology*, 2004, 3: 309–316

LARUMBE, R. ; VIÑES, J. ; GUILLÉN, F. ; GAMINDE, I. ; ARTÁZCOZ, M.: Asociación inversa entre consumo de tabaco y enfermedad de parkinson idiopática. En: *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 1999, 22(1): 17-23

LEE, K. ; IM, J. ; WOO, J. ; GROSSO, H. ; KIM, Y. ; CRISTOVAO, A. ; SONSALLA, P. ; SCHUSTER, D. ; JALBUT, M. ; FERNANDEZ, J. ; VORONKOV, M. ; JUNN, E. ; BRAITHWAITE, S. ; STOCK, J. ; MOURADIAN, M.: Neuroprotective and anti-inflammatory properties of a coffee component in the MPTP model of Parkinson's disease. En: *Neurotherapeutics*, 2013, 10(1): 143-153

LESNICK, T. ; PAPAPETROPOULOS, S. ; MASH, D. ; FFRENCH-MULLEN, J. ; SHEHADEH, L, ; DE ANDRADE, M. ; HENLEY, J. ; ROCCA, W. ; AHLSKOG, J. ; MARAGANORE, D.: A genomic pathway approach to a complex disease: axon guidance and Parkinson disease. En: *PLOS Genetics,* 2007, 3(6): 98

LÓPEZ, M. ; GUERRERO, J. ; YESCAS, P. ; BOLL, M. ; FAMILIAR, I. ; OCHOA, A. ; RASMUSSEN, A. ; ALONSO, M.: Apolipoprotein E epsilon4 allele is associated with Parkinson disease risk in a Mexican Mestizo population. En: *Movement Disorders Journal,* 2007, 22: 417-420

MAHADEVAN, R. ; SCHILLING, C.: The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. En: *Metabolic Engineering*, 2003, 5: 264–276

MAKER, H. ; WEISS, C. ; SILIDES, D. ; COHEN, G.: Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. En: *Journal of Neurochemistry*, 1981: 36: 589-593

MANICHAIKUL, A. ; GHAMSARI, L. ; HOM, E. ; LIN, C. ; MURRAY, R. ; CHANG, R. ; BALAJI, S. ; HAO, T. ; SHEN, Y. ; CHAVALI, A. ; THIELE, I. ; YANG, X. ; FAN, C. ; MELLO, E. ; HILL, D. ; VIDAL, M. ; SALEHI-ASHTIANI, K. ; PAPIN, J.: Metabolic network analysis integrated with transcript verification for sequenced genomes. En: *Nature Methods*, 2009, 6: 589–592

MARTÍNEZ, M. ; RUBIO, G.: Manual de drogodependencias para enfermería. Ediciones Díaz de Santos, España, 2002

MATTHEWS, D.: An Overview of Phenylalanine and Tyrosine Kinetics in Humans. En: *Journal of Nutrition*, 2007, 137(6-1): 1549-1575

MICHELI, F. ; FERNÁNDEZ, M.: Neurología en el anciano. Editorial Médica Panamericana. Primera edición. Páginas 159-180. Capítulo 14. Buenos Aires, Argentina, 1996

MITCHELL, D. ; KNIGHT, C. ; HOCKENBERRY, J. ; TEPLANSKY, R. ; HARTMAN, T.: Beverage caffeine intakes in the U.S. En: *Food and Chemical Toxicology*, 2014; 63: 136–142

MOHANAKUMAR, K. ; MURALIKRISHNAN, D. ; THOMAS, B.: Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. En: *Brain Research*, 2000, 864: 281–90

MORRIS, E.: Movement Disorders in People With Parkinson Disease: A Model for Physical Therapy. En: *Physical Therapy,* 2000, 80(6): 578-597

MOUSSA, B. ; YOUDIM, EDMONDSON, D. ; TIPTON, K.: The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. En: *Nature Reviews Neuroscience,* 2006, 7: 295-309

NEHLIG, A. ; DAVAL, J. ; DEBRY, G.: Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. En: *Brain Research Reviews,* 1992, 17(2): 139-170

NOVICK, P. ; OSMOND, B. ; BOTSTEIN, D.: Suppressors of yeast actin mutations. En: *Genetics*, 1989, 121: 659–674

OBERHARDT, M. ; PALSSON, B. ; PAPIN, J.: Applications of genome-scale metabolic reconstructions. En: *Molecular Systems Biology*, 2009, 5(320): 1-15

OBERHARDT, M. ; PUCHALKA, J. ; FRYER, K. ; MARTINS DOS SANTOS, V. ; PAPIN, J.: Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. En: *Journal of Bacteriology*, 2008, 190: 2790–2803

ORTH, J. ; THIELE, I. ; PALSSON, B.: What is flux balance analysis?. En: *Nature Biotechnology,* 2010, 28(3): 245–248

OSORIO, D. ; BOTERO, K. ; GONZALEZ, J. ; PINZON-VELASCO, A.: exp2flux: convert EXPression data to FBA FLUXes. R package version 0.1, 2016

OVERBEEK, R. ; DISZ, T. ; STEVENS, R.: The SEED: A peer-to-peer environment for genome annotation. En: *Communications of the ACM*, 2004, 47: 46–51

PALSSON, B.: Representing Reconstructed Networks Mathematically: The Stoichiometric Matrix. University of California San Diego, Department of Bioengineering, Systems Biology Research Group, 2003

PANKRATZ, N. ; FOROUD, T.: Genetics of Parkinson disease. En: *Genetics in Medicine*, 2007, 9: 801-811

PARKINSON'S DISEASE FOUNDATION.: Tratando el Parkinson, Comprendiendo la Medicación. En: http://www.pdf.org/pdf/fses_comprendiendo_medicacion_12.pdf

PHARKYA, P. ; BURGARD, A. ; MARANAS, C.: OptStrain: A computational framework for redesign of microbial production systems. En: *Genome Research*, 2004, 14: 2367–2376

PHARKYA, P. ; MARANAS, C.: An optimization framework for identifying reaction activation/inhibition or elimination candidates for overproduction in microbial systems. En: *Metabolic engineering*, 2006, 8: 1–13

POOLMAN, M. ; BONDE, B. ; GEVORGYAN, A. ; PATEL, H. ; FELL, D.: Challenges to be faced in the reconstruction of metabolic networks from public databases. En: *Systems Biology*, 2006, 153: 379-384

POPOLI, P. ; CAPORALI, M. ; SCOTTI DE CAROLIS, A.: Akinesia due to catecholamine depletion in mice is prevented by caffeine. Further evidence for an involvement of adenosinergic system in the control of motility. En: *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1991, 43: 280-281

POWERS, K. ; KAY, D. ; FACTOR, S. ; ZABETIAN, C. ; HIGGINS, D. ; SAMII, A. ; NUTT, J. ; GRIFFITH, A. ; LEIS, B. ; ROBERTS, J. ; MARTINEZ, E. ; MONTIMURRO, J. ; CHECKOWAY, H. ; PAYAMI, H.: Combined effects of smoking, coffee, and NSAIDs on Parkinson's disease risk. En: *Movement Disorders*, 2008, 23(1): 88-95

QUIK, M. ; O'LEARY, K. ; TANNER, C.: Nicotine and Parkinson's disease; implications for therapy. En: *Movement Disorders,* 2008, 23(12): 1641–1652

RADRICH, K. ; TSURUOKA, Y. ; DOBSON, P. ; GEVORGYAN, A. ; SWAINSTON, N. ; BAART, G. ; SCHWARTZ, J.: Integration of metabolic databases for the reconstruction of genome-scale metabolic networks. En: *BMC Systems Biology,* 2010, 4:114

RAMAN, K. ; CHANDRA, N.: Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges. En: *Briefings in Bioinformatics*, 2009, 10(4): 435-449

REED, J. ; PALSSON, B.: Genome-scale in silico models of *E. coli* have multiple equivalent phenotypic states: assessment of correlated reaction subsets that comprise network states. En: *Genome Research*, 2004, 14(9):1797

REES, K. ; STOWE, R. ; PATEL, S. ; IVES, N. ; BREEN, K. ; CLARKE, C. ; BEN-SHLOMO, Y.: Non-steroidal anti-inflammatory drugs as disease-modifying agents for Parkinson's disease: evidence from observational studies. En: *Cochrane Database of Systematic Reviews,* 2011, 11: 1-59

REHNCRONA, S.: Brain acidosis. En: *Annals of Emergency Medicine,* 1985, 14(8): 770-776

RIVERA-ORDÓÑEZ, A.: AINE: su mecanismo de acción en el sistema nervioso central. En: *Revista Mexicana de Anestesiología*, 2006, 29(1): 36-40

ROSENBERG, D. ; STEPHENS, M.: Use Case Driven Object Modeling with UML Theory and Practice. Editor: Apress, Edición: 2, 2007

ROSIN, D. ; HETTINGER, B. ; LEE, A. ; LINDEN, J.: Anatomy of adenosine A2A receptors in brain: morphological substrates for integration of striatal function. En: *Neurology*, 2003, 61: 12-18

ROSS, G. ; ABBOTT, R. ; PETROVITCH, H. ; MORENS, D. ; GRANDINETTI, A. ; TUNG, K. ; TANNER, C. ; MASAKI, K. ; BLANCHETTE, P. ; CURB, J. ; POPPER, J. ; WHITE, L.:

Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. En: *Jama*, 2000, 283(20): 2674-2679

SAGGU, H.: A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. En: *Journal of Neurochemistry*, 1989, 53: 692-697

SÄÄKSJÄRVI, K. ; KNEKT, P. ; RISSANEN, H. ; LAAKSONEN, M. ; REUNANEN, A. ; MÄNNISTÖ, S.: Prospective study of coffee consumption and risk of Parkinson's disease. En: *European Journal of Clinical Nutrition*, 2008, 62: 908-915

SAMII, A. ; NUTT, J. ; RANSOM, B.: Parkinson's disease. En: *Lancet,* 2004, 363: 1783–1793

SCHELLENBERGER, J. ; QUE, R. ; FLEMING, R. ; THIELE, I. ; ORTH, J. ; FEIST, A. ; ZIELINSKI, D. ; BORDBAR, A. ; LEWIS, N. ; RAHMANIAN, S. ; KANG, J. ; HYDUKE, D. ; PALSSON, B.: Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. En: *Nature Protocols*, 2011, 6: 1290-1307

SAVITT, J. ; DAWSON, V. ; DAWSON, T.: Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. En: *Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116: 1744–1754

SAWYNOK, J.: Methylxanthines and pain. En: *Handbook of Experimental Pharmacology,* 2011, 200: 311-329

SHERER, T. ; BETARBET, R. ; GREENAMYRE, J.: Pathogenesis of Parkinson's disease. En: *Current Opinion in Investigational Drugs,* 2001, 2: 657-662

SINGH, N. ; PILLAY, V. ; CHOONARA, Y.: Advances in the treatment of Parkinson's disease. En: *Progress in Neurobiology*, 2007, 81: 29–44

SOFIC, E.: Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. En: *Journal of Neural Transmission*, 1988, 74: 199-205

SOLINAS, M. ; FERRÉ, S. ; YOU, Z. ; KARCZ-KUBICHA, M. ; POPOLI, P. ; GOLDBERG, S.: Caffeine Induces Dopamine and Glutamate Release in the Shell of the Nucleus Accumbens. En: *Journal of Neuroscience*, 2002, 22(15): 6321-6324

SOLOMON, I. ; COLLINS, W.: Characterization of Respiratory Activity in Spontaneously Breathing Urethane-Anesthetized 6-OHDA SN-lesioned Parkinson's Disease Rat Model. En: *The FASEB Journal*, 2016, 30(1): 128

STARKE, R. ; CHALOUHI, N. ; DING, D. ; HASAN, D.: Potential Role of Aspirin in the Prevention of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. En: *Cerebrovascular Diseases*, 2015, 332–342

SUTHERS, P. ; DASIKA, M. ; KUMAR, V. ; DENISOV, G. ; GLASS, J. ; MARANAS, C.: A genome-scale metabolic reconstruction of *Mycoplasma genitalium*, iPS189. En: *PLoS Computational Biology*, 2009, 5: 1000285

SUGITA, M. ; IZUNO, T. ; TATEMICHI, M. ; OTAHARA, Y.: Meta-analysis for epidemiologic studies on the relationship between smoking and Parkinson's disease. En: *Journal of Epidemiology*, 2001, 11: 87-94

SULZER, D. ; SONDERS, M. ; POULSEN, N. ; GALLI, A.: Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. En: *Progress in Neurobiology,* 2005, 75: 406-33

SVED, S. ; HOSSIE, R. ; MCGILVERAY, I.: The human metabolism of caffeine to theophylline. En: *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 1976, 13(2): 185-192

TANAKA, H. ; NAKAZAWA, K.: Maternal caffeine ingestion increases the tyrosine level in neonatal rat cerebrum. En: *Biology of the Neonate*, 1990, 57(2):133-139

TASSANEEYAKUL, W. ; BIRKETT, D. ; MCMANUS, M. ; TASSANEEYAKUL, W. ; VERONESE, M. ; ANDERSSON, T. ; TUKEY, R. ; MINERS, J.: Caffeine metabolism by human hepatic cytochromes p450: Contributions of 1A2, 2E1 and 3A isoforms. En: *Biochemical Pharmacology,* 1994, 47(10): 1767-1776

TEISMANN, P. ; FERGER, B.: Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. En: *Synapse,* 2001, 39: 167–174

THIELE, I. ; FLEMING, R. ; BORDBAR, A. ; SCHELLENBERGER, J. ; PALSSON, B.: Functional characterization of alternate optimal solutions of *Escherichia coli's*

transcriptional and translational machinery. En: *Biophysical Journal, 2010,* 98(10): 2072–2081

THIELE, I. ; PALSSON, B.: A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. En: *Nature Protocols*, 2010, 5(1): 93-121

THIELE, I. ; SWAINSTON, N. ; FLEMING, R. ; HOPPE, A. ; SAHOO, S. ; AURICH, M. ; HARALDSDOTTIR,H. ; MO, M. ; ROLFSSON, O. ; STOBBE, M. ; THORLEIFSSON, S. ; AGREN, R. ; BÖLLING, C. ; BORDEL, S. ; CHAVALI, A. ; DOBSON, P. ; DUNN, W. ; ENDLER, L. ; HALA, D. ; HUCKA,M. ; HULL, D. ; JAMESON, D. ; JAMSHIDI, N. ; JONSSON, J. ; JUTY, N. ; KEATING, S. ; NOOKAEW, I. ; NOVÈRE, N. ; MALYS, N. ; MAZEIN, A. ; PAPIN, J. ; PRICE, N. ; SELKOV, E. ; SIGURDSSON, M. ; SIMEONIDIS, E. ; SONNENSCHEIN, N. ; SMALLBONE, K. ; SOROKIN, A. ; VAN BEEK, J. ; WEICHART, D. ; GORYANIN, I. ; NIELSEN, J. ; WESTERHOFF, H. ; KELL, D. ; MENDES, P. ; PALSSON, B.: A community-driven global reconstruction of human metabolism. En: *Nature Biotechnology*, 2013, 31: 419–425

THIRIEZ, C. ; VILLAFANE, G. ; GRAPIN, F. ; FENELON, G. ; REMY, P. ; CESARO, P.: Can nicotine be used medicinally in Parkinson’s disease?. En: *Expert Review of Clinical Pharmacology,* 2011, 4(4): 429–436

THORN, C. ; AKLILLU, E. ; MCDONAGH, E. ; KLEIN, T. ; ALTMAN, RUSS.: PharmGKB summary: caffeine pathway. En: *Pharmacogenetics and genomics*, 2012, 22(5): 389-395

TON, T. ; HECKBERT, S. ; LONGSTRETH, W. ; ROSSING, M. ; KUKULL, W. ; FRANKLIN, G. ; SWANSON, P. ; SMITH-WELLER, T. , CHECKOWAY, H.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease. En: *Movement Disorders*, 2006, 21: 964–969

TORRES, G. ; GAINETDINOV, R. ; CARON, M.: Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. En: *Nature Reviews Neuroscience,* 2003, 4: 13-25

VARMA, A. ; PALSSON, B.: Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. En: *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60: 3724–3731

VIDRIO, H. ; ALONSO, E. ; LÓPEZ, M.: Factores genéticos involucrados en la susceptibilidad para desarrollar enfermedad de Parkinson. En: *Salud Mental,* 2007, 30: 16-24

VOLKOW, N. ; WANG, G. ; LOGAN, J. ; ALEXOFF, D. ; FOWLER, J. ; THANOS, P. ; WONG, C. ; CASADO, V. ; FERRE, S. ; TOMASI, D.: Caffeine increases striatal dopamine D2/D3 receptor availability in the human brain. En: *Translational Psychiatry*, 2015, 5: 549

WIRDEFELDT, K. ; ADAMI, H. ; COLE, P. ; TRICHOPOULOS, D. ; MANDEL, J.: Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. En: *European Journal of Epidemiology,* 2011, 26(1): 1-58

YOUNG, S.: L-Tyrosine to alleviate the effects of stress?. En: *Journal of Psychiatry & Neuroscience,* 2007, 32(3): 224

ZAHNISER, N. ; SIMOSKY, J. ; MAYFIELD, R. ; NEGRI, C. ; HANANIA, T. ; LARSON, G. ; KELLY, M. ; GRANDY, D. ; RUBINSTEIN, M. ; LOW, M. ; FREDHOLM, B.: Functional uncoupling of adenosine A(2A) receptors and reduced response to caffeine in mice lacking dopamine D2 receptors. En: *Journal of Neuroscience*, 2000, 20: 5949-5957