CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS



DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Monterrey

Estudio de la sincronización de las oscilaciones en grupos de células del Mesodermo Presomítico durante la somitogénesis.

Tesis que presenta: Jésus Pantoja Hernández

Para obtener el grado de: Maestria en Ciencias con Especialidad en Ingeniería y Física Biomédicas

> Director de Tesis: Dr. Moisés Santillán Zerón

Apodaca, Nuevo León

Agosto de 2016

Dedicatoria

A mis padres por haberme dado la vida.

A mi esposa Yadith por su cariño, apoyo y comprensión y a mi hija Abigaíl por brindarme la dicha de ser padre.

Agradecimientos

A mi asesor el Dr. Moisés Santillán por sus acertados consejos para la realización de esta tesis.

A mis sinodales el Dr. Jesús Rodríguez y el Dr. Daniel Sánchez por sus comentarios para pulir este trabajo.

Al Conacyt por el apoyo económico que me otorgó, sin el cual no hubiera sido posible este logro en mi vida profesional.

Lista de Abreviaturas.

MSP- Mesodermo Presomítico. FGF- Factor de Crecimiento Fibroblástico. AR- Ácido Retinoico. NECD-Dominio celular externo de Notch. TM- Dominio transmembranal. NICD-Dominio intracelular de Notch. PO- Parámetro de orden. SE- Error estándar T-T- Todas con todas. PV- Primeros vecinos. Hex- Hexagonal.

Resumen

En todos los sistemas biológicos parece existir un principio de auto-regulación consistente en la repetición rítmica de algún proceso, en muchas ocasiones estos procesos son químicos, de manera que los fenómenos rítmicos observados corresponden a reacciones químicas acopladas, cuyas interacciones producen oscilaciones en las concentraciones de las soluciones involucradas. En otras ocasiones, el comportamiento periódico da lugar a la formación de estructuras espaciales periódicas muy complejas. Un proceso donde se presenta este fenómeno es en la somitogénesis. Este proceso se lleva a cabo en el desarrollo embrionario de los vertebrados, el cual consiste en la segmentación del Mesodermo Presomítico (MSP) en bloques de células llamados somitas. Este proceso se da de manera periódica, y la sincronización que deben tener estas células es fundamental para que este proceso se desarrolle de forma normal. Este estudio esta enfocado en analizar cómo se ve afectada la sincronización en función de la cantidad de células que están en comunicación, además de la configuración que tengan al estar en contacto.

Abstract

In all biological systems appears to be a principle of self-regulation consisting rhythmic repetition of some process, often these processes are chemical, so that the observed rhythmic phenomena correspond to coupled chemical reactions, whose interactions produce oscillations in concentrations solutions involved. At other times, the periodic behavior leads to the formation of complex periodic spatial structures. A process in which this phenomenon occurs is in the somitogenesis. This process takes place in the embryonic development of vertebrates, which consists in the segmentation of presomitic mesoderm (PSM) in blocks of cells called somites. This process occurs periodically, and the synchronization that must have these cells is essential for this process to develop normally. This study is focused on analyzing how synchronization is affected depending on the number of cells that are in communication, as well as the configuration that they have when are in contact.

Índice general

1.	Introducción 2			
	1.1. Sou	mitogénesis	2	
	1.2. Fre	ente de Onda	3	
	1.3. Re	loj de Segmentación	4	
	1.4. Vía	a de señalización Delta-Notch	5	
	1.5. An	tecedentes	7	
2.	. Hipótesis y Objetivos			
	2.1. Hip	pótesis	9	
	2.2. Ob	jetivo General	9	
	2.3. Ob	jetivos Particulares	9	
3.	Metodología		10	
	3.1. De	scripción del Modelo	10	
	3.2. Est	timación de los parámetros	13	
	3.3. Par	rámetro de Orden	14	
4.	Resultados y discusiones.		16	
	4.1. Sin	cronización al variar las condiciones iniciales	16	
	4.2. Sincronización al variar la fuerza de conexión		20	
	4.3. Sin	ncronización al considerar la variabilidad celular. \ldots	26	
5.	Conclusiones. 3		32	

6.	Trabajo a futuro.	34
7.	Apéndice.	36

Capítulo 1

Introducción

1.1. Somitogénesis.

La somitogénesis es un proceso que se lleva a cabo en el desarrollo embrionario de los vertebrados, e inicia después de la aparición del Mesodermo Presomítico (MSP). La aparición de este tejido embrionario se da durante la etapa de gastrulación [1]. Esta etapa se caracteriza por diversas migraciones y diferenciaciones celulares que dan origen a una capa trilaminar, formada por 3 diferentes tipos de células: células de ectodermo, mesodermo y endodermo [2] . Posteriormente el mesodermo se divide en mesodermo lateral, mesodermo intermedio y mesodermo presomítico. Este último se segmenta durante la somitogénesis en bloques de células llamados somitas [3]. Los somitas posteriormente darán origen a diversos tejidos del dorso como: costillas, vertebras, músculo esquelético y dermis [4]. La aparición de los somitas se caracteriza por dos fenómenos: el frente de onda y el reloj de segmentación [5].

1.2. Frente de Onda.

Esta característica que presenta la somitogénesis se asocia con el alargamiento producido por la proliferación de las células situadas en la porción más posterior de la región no segmentada del MSP. Las células de esta zona se reproducen por la influencia de una concentración local elevada del Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) [6]. Por otro lado, en la parte más anterior, donde las células son más viejas, la concentración de FGF es menor, ya que las moléculas de FGF se degradan según pasa el tiempo. Ademas de lo anterior, las células más cercanas al último somita quedan expuestas a concentraciones crecientes de Ácido Retinoico (AR), producido en los somitas más posteriores y cuya acción es opuesta a la del FGF. En este proceso llega un punto en el que, en un mismo instante, las células son expuestas a un equilibrio de concentraciones entre FGF y AR, formando como consecuencia del entrecruzamiento de las dos concentraciones un umbral de desarrollo o "frente de onda" que las prepara para el proceso de formación de los somitas [7], ver figura 1.1.



Figura 1.1: Frente de onda consistente de gradientes opuestos de ácido retinoico (AR)y factor de crecimiento fibroblástico (FGF).

Con el alargamiento continuo del embrión y el añadido de nuevos somitas, la localización del frente de onda se va extendiendo caudalmente en el embrión permaneciendo a una distancia constante del último par de somitas formados [7].

1.3. Reloj de Segmentación.

Otra característica fundamental en la aparición de los somitas es la periodicidad con la que se forman, la cual es regulada por el reloj de segmentación. Este es un oscilador a nivel genético y con cada ciclo de este reloj se genera un nuevo par bilateral de somitas. El periodo del reloj determina el número y el largo de estos bloques de células [8]. Este oscilador genético opera dentro del MSP de los embriones de vertebrados en desarrollo y genera oscilaciones transcripcionales que dirigen el ritmo en la formación secuencial de acuerdo a la elongación que va presentando el embrión [7].

Las oscilaciones en la expresión de estos genes son originadas por el efecto inhibitorio que tienen sobre ellos mismos. En la figura 1.2 se esquematiza de forma resumida esta interacción. Como se puede observar, cuando el gen lleva a cabo la expresión de su proteína, esta produce un efecto inhibitorio en su propia transcripción. Este lazo de retroalimentación negativa, junto con los retardos involucrados tanto en la transcripción como en la traducción, son los responsables de producir las oscilaciones en las concentraciones de las proteínas [9].



Figura 1.2: Autoregulación de los genes her1/7. La activación de los genes her1/7 produce un efecto inhibitorio en su propia tanscripción despúes de cierto retardo (Tm + Tp), debido a esto se generan las oscilaciones.

Estas oscilaciones se generan en cada una de las células del MPS, pero adicional al efecto autorepresor de los genes, estas células interactúan con las células adyacentes por medio de la vía de señalización Delta-Notch, permitiendo su comunicación. Así, esta vía permite la sincronización de las oscilaciones individuales que presenta cada célula [10].

1.4. Vía de señalización Delta-Notch.

La vía de señalización Notch esta presente en muchos procesos celulares que van desde regular el destino celular, controlar la proliferación, así como procesos involucrados en la apoptosis [11]. En la somitogénesis se sabe que la función principal de la vía de señalización Delta-Notch es la de sincronizar las oscilaciones de las células del MSP [10]. Esta vía de señalización en la somitogénesis de mamíferos funciona de la siguiente manera: Notch es una proteína transmembranal compuesta por 3 segmentos: el dominio celular externo de Notch (NECD), el dominio transmembranal (TM) y el dominio intracelular de Notch (NICD). NECD funciona como receptor de varios ligandos. Para el caso de células del MSP, se une a ligandos de la familia Delta. Una vez que el ligando Delta de una célula se une al receptor Notch de una célula vecina se libera el NICD, el cual es capaz de llegar al núcleo celular y actuar como factor de transcripción para los genes objetivo (por ejemplo en el caso del pez cebra los genes de la familia her) [12], promoviendo su activación. Un esquema representativo del mecanismo anteriormente descrito se muestra en la figura 1.3.



Figura 1.3: Representación de la interacción de 2 células por medio de la vía de señalización Delta-Notch. Las lineas en verde representan activación y las rojas inhibición.

Como ya dijimos, la interacción entre células del MSP, que se produce mediante la vía de señalización Delta-Notch, permite sincronizar las oscilaciones que presenta cada célula. De acuerdo a experimentos realizados con ratones en donde se induce una mutación en el gen que codifica el ligando Delta, evitando la comunicación entre células, se provoca que estas células no se sincronicen, dando como resultado deformaciones en los somitas [13]. Finalmente esto último se refleja en la formación anómala de costillas y vertebras. Este mismo efecto se ha visto en humanos con displasia espondilocostal; un padecimiento congénito que se ha asociado a mutaciones del gen delta [14].

1.5. Antecedentes.

El comportamiento cíclico en la formación de los somitas es un fenómeno que esta muy estudiado y se han desarrollado diversos modelos con el fin de analizar su comportamiento. Por ejemplo, Lewis [9] parte de un sistema de dos ecuaciones diferenciales y considera los retardos asociados a la transcripción y a la traducción, para modelar las oscilaciones que se presentan en el mRNA y sus proteínas, tal cual ocurre en la somitogénesis con los genes de la familia her/hes. El modelo desarrollado en este trabajo solo considera el comportamiento de una proteína. Posteriormente se desarrollo un modelo que considera el efecto de las proteínas Her1, Her7 y Delta [10], donde se incluye el efecto de la interacción Delta-Notch entre dos células y se analiza bajo qué condiciones se sincronizan. En otro trabajo realizado por Schroter et al. [15], se obtuvo un modelo que reproduce los resultados obtenidos de experimentos en pez cebra donde además de las proteínas Her1 y Her7 se considera a la proteína Hes6, que a pesar que su expresión es constante presenta oscilaciones en su concentración debido a que se dimeriza con las proteínas Her1 y Her7 las cuales tienen un comportamiento oscilatorio. Un modelo más complejo enfocado al estudio de la sincronización en un grupo de 16 células del MSP fue realizado por Ahmet Ay et al. [16]. En este estudio se consideran las interacciones de las proteínas Her1, Her7, Hes6 y Delta y se enfocan en estudiar la sincronización que presenta este grupo de 16 células al simular la mutación de alguno de estos genes para evitar se expresión. En los estudios mencionados anteriormente no se ha considerado que las células de MSP pueden estar en comunicación de diferentes maneras, ni cómo se ve afectada la sincronización al aumentar progresivamente la cantidad de células que se comunican. Esos puntos son los que se busca analizar en este trabajo, además de considerar cómo la variabilidad celular afecta la sincronización.

Capítulo 2

Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis.

Durante la somitogénesis la sincronización de las oscilaciones individuales en las células del MPS se favorece a medida que aumenta la cantidad de células que se comunican, así como al aumentar el número de conexiones y la fuerza de las mismas.

2.2. Objetivo General.

Analizar la sincronización de las oscilaciones en grupos de células del MPS con diferente tamaño y diferentes formas de comunicación durante la somitogénesis.

2.3. Objetivos Particulares.

2.3.1. Estudiar el fenómeno de sincronización con un modelo de osciladores acoplados.

2.3.2. Analizar la sincronización al aumentar la cantidad de células en comunicación.

2.3.3. Analizar la sincronización al aumentar el número de conexiones entre células.

2.3.4. Analizar la sincronización al aumentar la fuerza de conexión.

Capítulo 3

Metodología

3.1. Descripción del Modelo

El modelo que se desarrollo esta basado en el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales con retardo [9].

$$\frac{dm(t)}{dt} = f(p(t-\tau_m)) - b_m m(t)$$
(3.1)

$$\frac{dp(t)}{dt} = a_p m(t - \tau_p) - b_p p(t)$$
(3.2)

El sistema de ecuaciones (3.1) y (3.2) describe la dinámica del mRNA (dm(t)/dt)y su proteína (dp(t)/dt), donde cada ecuación consta de sus correspondientes términos de producción y degradación. Partiendo de este sistema y sabiendo que la dinámica de la proteína es más lenta que la del mensajero, podemos considerar una hipótesis de estado cuasi-estacionario y por lo tanto la ecuación (3.1) se puede tomar igual a 0, se despeja m(t) y se sustituye en la ecuación (3.2). Con esto, el sistema se simplifica quedando solo una ecuación que define el comportamiento de la proteína. Ademas, si normalizamos con respecto a la amplitud máxima y dado que hay involucrados retardos, cambiamos la escala de tiempo para que tenga como unidad el retardo total involucrado, nos queda la siguiente ecuación diferencial con retardo que representa el comportamiento de la proteína:

$$\frac{dP(t)}{dt} = \gamma_P(f(P(t-1)) - P(t))$$
(3.3)

donde dP(t)/dt representa la razón de cambio de la proteína con respecto el tiempo, la cual cuenta con sus correspondientes términos de producción y degradación. El parámetro γ_P es la respectiva tasa de degradación y f(P) es una función que representa la producción de la proteína. Dicha producción es afectada por un lazo de retroalimentación negativa y por ello es una función decreciente de la forma:

$$f(P) = \frac{k_P^2}{k_P^2 + P^2},$$

donde el parámetro k_P es la constante de saturación al 50 %.

La ecuación (3.3) modela la dinámica de una proteína aislada, pero en la células del MSP interactúan las proteínas Her y Delta, las primeras con la capacidad de inhibir tanto a las proteínas Delta como a ellas mismas. Considerando esta interacción el modelo se modifica como sigue:

$$\frac{dx}{dt} = \gamma_x(f(x(t-1)) - x(t)) \tag{3.4}$$

$$\frac{dy}{dt} = \gamma_y(h(x(t-\tau_y)) - y(t)) \tag{3.5}$$

donde dx/dt y dy/dt representan las razones de cambio con respecto al tiempo de las proteínas Her y Delta, respectivamente, en tanto que, γ_x y γ_y son las correspondientes tasas de degradación, τ_y es el retardo involucrado en la producción de la proteína Delta, f(x) y h(x) son las funciones que representan el efecto inhibitorio de la proteína Her y están definidas como sigue:

$$f(x) = \frac{k_f^2}{k_f^2 + x^2}$$

у

$$h(x) = \frac{k_h^2}{k_h^2 + x^2}$$

donde: k_f y k_h son las correspondientes constantes de saturación al 50 %. Ademas como ya se menciono las células del MSP también interactúan con sus vecinas por medio de la vía de señalización Delta-Notch. Para tomar en cuenta esta interacción el modelo se modifica como sigue (en el caso de dos células interactuando):

$$\frac{dx_1}{dt} = \gamma_{x_1}(f(x_1(t-1))e(y_2(t-1)) - x_1)$$
(3.6)

$$\frac{dy_1}{dt} = \gamma_{y_1}(h(x_1(t-\tau_y)) - y_1)$$
(3.7)

$$\frac{dx_2}{dt} = \gamma_{x_2}(f(x_2(t-1))e(y_1(t-1)) - x_2)$$
(3.8)

$$\frac{dy_2}{dt} = \gamma_{y_2}(h(x_2(t-\tau_y)) - y_2)$$
(3.9)

El conjunto de ecuaciones (3.6) - (3.9) componen el modelo básico de interacción con dos células, en donde ademas de las funciones f(x) y h(x) interviene la función e(x). Esta función representa el efecto promotor de las proteínas Delta sobre sus vecinas, por tanto esta función es creciente y está definida como sigue:

$$e(y) = \frac{y^2}{k_e^2 + y^2},$$

donde, de igual manera que en las funciones f(x) y h(x), el parámetro k_e es la constante de saturación al 50 %.

Como parte fundamental de este trabajo y para llevar a cabo el objetivo particular 2.3.3, se considerará que las células pueden estar en contacto de 3 formas diferentes. En la primera de ellas se considera que cada célula pueda estar en contacto con todas las demás que compongan el modelo. La segunda opción es que cada célula este en contacto con sus primeras vecinas. Esto significa que cada célula solo tendrá contacto directo con dos células, y finalmente la tercera opción se considerará que las células tienen forma hexagonal y por lo tanto cada célula estará en contacto directo con 6 células vecinas. La figura 2.1 muestra una representación de las 3 diferentes formas de analizar la comunicación entre las células.



Figura 3.1: Diferentes formas de considerar la comunicación entre células. a) Todas con todas (T-T). b) Primeros vecinos (PV). c) Considerando las células en forma hexagonal (Hex).

3.2. Estimación de los parámetros.

Los parámetros utilizados en el modelo se obtuvieron a partir de un trabajo de Ahmet Ay et al. [16]. Dado que nuestro modelo esta normalizado con respecto a la amplitud máxima y el tiempo de retardo de la proteína x, los parámetros aquí utilizados son adimensionales. Con base en los valores reportados se calcularon los rangos para cada parámetro. Los resultados se muestran en la tabla 3.1.

Parámetro	Rango	Valor base
γ_x	1.50 - 5.0	3.41
γ_y	1.50 - 5.0	3.20
k_f	0.001-0.35	0.06
k_h	0.001-0.35	0.07
k_e	0.001-0.35	0.05
$ au_x$	0.5-1.2	1.0
$ au_y$	0.3-0.9	0.85

 Tabla 3.1:
 Valores de los parámetros utilizados

La primer columna de la tabla 1, se refiere al parámetro correspondiente, la segunda columna contiene el rango de valores que se aproximan a la realidad biológica, la tercer columna indica los valores usados en este trabajo.

3.3. Parámetro de Orden.

El análisis esencial de este trabajo se basa en el estudio del fenómeno de sincronización que se presenta en las células del MSP. Para cuantificar esta característica, se utilizará el parámetro de orden (PO), qué nos dice que tan en fase están un grupo de osciladores [17], y que está definido de la siguiente manera:

$$PO = \frac{Var(M)}{Var(b_i)},$$

donde Var(M) se refiere a la varianza de la media de todos los osciladores y $\overline{Var(b_i)}$ al promedio de las varianzas de todos los osciladores. Este parámetro

toma un valor entre 0 y 1; da como resultado 0 cuando no hay sincronización y 1 cuando se presenta una sincronización perfecta [18].

Para solucionar las ecuaciones del modelo, estas se implementaron en Python, y se utilizó la librería PyDelay. Esta librería utiliza el método Bockagi-Shampine para la solución de ecuaciones diferenciales con retardo.

Capítulo 4

Resultados y discusiones.

4.1. Sincronización al variar las condiciones iniciales.

Todas las gráficas presentadas en este capítulo son el resultado de 3 simulaciones, se mostrara el promedio con sus barras de error estándar (SE), el cual esta definido de la siguiente manera: $SE = \sigma/\sqrt{n}$, donde σ es la desviación estándar y n el número de simulaciones.

Los primeros resultados a analizar se obtuvieron al variar las condiciones iniciales en cada una de las 3 configuraciones. Esta variación se realizó tomando valores aleatorios de una distribución normal con una media de 0.5, que corresponde a la mitad del valor máximo normalizado, y una desviación estándar de 0.025 que equivale a un 5% de esta media, los valores para los demás parámetros son los correspondientes a la columna de valor base en la tabla 3.1. La primer configuración analizada es la correspondiente cuando las células tienen comunicación todas con todas (T-T), los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.1.



Figura 4.1: Comportamiento de la sincronización (parámetro de orden) en la configuración T-T, con respecto al tamaño del arreglo celular.

En la gráfica se muestra el comportamiento del parámetro de orden a medida que se va incrementando la cantidad de células que se comunican, como se puede ver, al llegar a una cantidad de 10 células, se logra la sincronización, este comportamiento es de esperarse, ya que al estar cada célula en comunicación con todas sus vecinas, todas las células son capaces de afectarse directamente y con esto favorecer su sincronización.

Ahora se hará un análisis en la configuración del tipo primeros vecinos (PV). En la que cada célula solo afecta directamente a dos células vecinas. Los resultados se muestran en la figura 4.2. Podemos ver como en términos generales, al considerar un arreglo de 30 células, el nivel de sincronización se mantiene muy bajo, sin embargo se aprecia que el parámetro de orden presenta con frecuencia dos valores, uno aproximado a 0.1 y el otro aproximado a 0. Estos cambios entre estos dos valores, nos indica que hay una tendencia de las células a formar grupos pequeños que si se llegan a sincronizar, pero no es posible que el grupo en su totalidad alcance a sincronizarse. Con este resultado se puede concluir que al limitar a 2, el número de células con las cuales cada una puede comunicarse de forma directa, no es posible que lleguen a sincronizarse aún y cuando el número de células se incremente.



Figura 4.2: Comportamiento de la sincronización en la configuración PV (Primeros Vecinos).

Ya se analizaron los casos extremos de comunicación entre grupos de células, una en la que todas las células se comunican directamente con todas sus vecinas, y otra en la que la comunicación directa esta limitada unicamente a dos células vecinas. Ahora analicemos una configuración intermedia. Esto es, consideraremos a las células como si tuvieran una forma hexagonal, y cada una de ellas pudiera comunicarse con 6 células vecinas. El resultado de este análisis se muestra en la figura 4.3.



Figura 4.3: Comportamiento de la sincronización al considerar a las células con forma Hexagonal.

En la gráfica se muestra en el eje de las x la cantidad de capas que se están tomando en cuenta para calcular el parámetro de orden. La cantidad de células que corresponden a cada capa se muestran en la tabla 4.1.

Capa	Cant. de células
1	7
2	19
3	37
4	61
5	91

Tabla 4.1: Cantidad de células que corresponden a cada capa.

En esta configuración, podemos ver que el valor del parámetro de orden muestra una tendencia a disminuir conforme se incrementa la cantidad de células. Esto nos dice que la comunicación directa con 6 células no es suficiente para lograr la sincronización. Este comportamiento va acorde con lo que se observo en la configuración de comunicación todas con todas, ya que en esa configuración la sincronización se logro hasta que el grupo de células llego a componerse por mas de 10 células, y dado que para la configuración hexagonal, las células tienen comunicación directa con máximo 6 células, es coherente que en esta configuración no se logre la sincronización.

Hasta aquí estos resultados nos indican que con los valores de parámetros empleados solo en la configuración de todas con todas se puede llegar a la sincronización al aumentar la cantidad de células, mientras que con la configuración de PV y Hex el aumentar la cantidad de células desfavorece la sincronización. Recordemos que esto es al variar solo las condiciones iniciales en el modelo.

4.2. Sincronización al variar la fuerza de conexión.

La vía de señalización Delta-Notch es el mecanismo por el cual las células tienen comunicación unas con otras, y por lo tanto la fuerza de conexión esta relacionada directamente con esta vía. En el modelo, esta relación está representada por las funciones h(x) y e(y), ya que por un lado la función h(x) indica cómo es afectada la síntesis de la proteína Delta en cada célula, y por el otro la función e(x) nos representa qué tan sensible es una célula de ser influenciada por la proteína Delta de su vecina. En dichas funciones los valores que regulan estos efectos son los parámetros k_h y k_e que hacen referencia a constantes de saturación al 50%. Estas constantes están definidas de la siguiente manera: $k = K_{disoc.}/K_{asoc}$. Por lo tanto el valor del parámetro k se comporta de manera inversa a la afinidad (K_{asoc}). Esto quiere decir que cuando se tiene una afinidad grande el parámetro k es pequeño y viceversa. Primero revisemos los resultados obtenidos al variar el parámetro k_h en la configuración T-T, la gráfica se muestra en la figura 4.4.



Figura 4.4: Comportamiento de la sincronización al variar progresivamente el parámetro k_h .

Los resultados obtenidos nos indican que para el parámetro k_h , se tiene que hay un rango de valores donde no se consigue la sincronización, y que además la cantidad de células influye para que se logre esta sincronización, ya que mientras mayor es el número de células en comunicación, el intervalo donde no se alcanza la sincronización se reduce, y ademas se puede ver que para valores de k_h mayores a 1.0, aunque se consideren solo dos células la sincronización se logra.

Bien, ahora consideremos el variar el parámetro k_e en la misma configuración de T-T. Los resultados se muestran en la figura 4.5.



Figura 4.5: Comportamiento de la sincronización al variar progresivamente el parámetro k_e .

Para el parámetro k_e se tiene un comportamiento un poco diferente en comparación con los resultados obtenidos para el parámetro k_h , ya que para cantidades mayores a 2 células se presentan 2 intervalos donde no se obtiene la sincronización, mientras que cuando se consideran solo 2 células, de manera similar al comportamiento al variar el parametro k_h se presenta un único intervalo, aunque en este caso muy amplio, donde no se logra la sincronización. También se puede ver que la cantidad de células favorece la sincronización, ya que de igual manera que con k_h , los intervalos donde no hay sincronización se reducen conforme aumenta la cantidad de células en comunicación.

Ahora analicemos los resultados al variar el parámetro k_h en la configuración de PV. Estos se muestran en la figura 4.6.



Figura 4.6: Comportamiento de la sincronización en configuración PV al variar el parámetro k_h .

En la gráfica podemos ver que al variar el parámetro k_h , el comportamiento es independiente de la cantidad de células, ya que los resultados muestran que para valores de k_h mayores a 1.0, para toda cantidad de células se alcanzan a sincronizar por igual, y en general tienen un comportamiento muy similar sin importar la cantidad de células que se analicen.

Enseguida analicemos la configuración de PV al variar el parámetro k_e , los resultados se muestran en la figura 4.7.



Figura 4.7: Comportamiento de la sincronización en configuración PV al variar el parámetro k_e .

Al variar el parámetro k_e , se observa una tendencia similar a lo observado en la configuración de T-T. Pero en este caso para una cantidad menor a 20 células se presenta un doble intervalo donde no hay sincronización, mientras que para grupos mayores de 20 células existe solo un intervalo muy amplio donde no hay sincronización. Este comportamiento es contrario al presentado en la configuración T-T, ya que en la configuración de T-T el doble intervalo se presenta cuando la cantidad de células es grande (mayor a 2 células), y el intervalo amplio donde no hay sincronización se presenta cuando solo se analizan 2 células. Esto indica que la cantidad de células afecta de manera inversa a la configuración en PV en comparación con la configuración de T-T cuando se varia el parámetro k_e .

Para terminar con los resultados al variar la fuerza de conexión, analicemos ahora la sincronización de la configuración Hex al variar el parámetro k_h . Los resultados se muestran en la figura 4.8.



Figura 4.8: Comportamiento de la sincronización al variar el parámetro k_h en configuración Hex.

En la gráfica de la figura 4.8, podemos ver cómo al variar el parámetro k_h la sincronización tiene una comportamiento similar al observado en el arreglo de primeros vecinos, donde la sincronización es independiente de la cantidad de células. En general se puede decir que el comportamiento de la sincronización en configuración PV y Hex al variar el parametro k_h es cualitativamente idéntico, solo que en este caso el valor de k_h donde se logra la sincronización se redujo de 1.0 en PV a 0.256 en Hex.

Ahora revisemos los resultados al variar el parámetro k_e en la configuración Hex. Los resultados se muestran en la figura 4-9.



Figura 4.9: Comportamiento de la sincronización al variar el parámetro k_e en configuración Hexagonal.

Al variar el parámetro k_e se observa un comportamiento similar a la configuración de T-T, pero con una leve diferencia, que el arreglo hexagonal muestra un comportamiento mas uniforme al incrementar la cantidad de células, lo que nos indica que con esta configuración, al variar el parámetro k_e la sincronización es menos dependiente de la cantidad de células comparada con la configuración T-T.

4.3. Sincronización al considerar la variabilidad celular.

Ya se hizo un análisis al variar las condiciones iniciales y la fuerza de conexión en grupos con diferentes cantidad de células para cada configuración, ahora vamos a tomar en cuenta la variabilidad celular. Con esto nos referimos a que haremos una variación simultánea de varios parámetros. Esta variación se hizo de la siguiente manera: se dejaron fijos los valores correspondientes a los retardos τ_x y τ_y , los valores de estos parámetros que se usaron para hacer las simulaciones son los que se muestran en la tabla 3.1. También se dejaron fijos los valores de k_h y k_e . Para los parámetros k_h y k_e se tomaron los valores respectivos en los cuales cada configuración presenta sincronización al variar las condiciones iniciales, los valores seleccionados para k_h y k_e en cada configuración se presentan en la tabla 4.2.

Parámetro	Valor fijo	Configuración
k_h	0.05	Todas con Todas
k_h	1.0	Primeros Vecinos
k_h	0.25	Hexagonal
k_e	0.01	Todas con Todas
k_e	0.01	Primeros Vecinos
k_e	0.01	Hexagonal

Tabla 4.2: Valores de k_h y k_e usados en cada configuración para simular la variabilidad celular.

La variación de los parámetros restantes se hizo de manera aleatoria. Se tomaron valores de una distribución normal con media igual a el correspondiente valor base que se muestra en la tabla 3.1, y se tomó una desviación estándar que va desde un 10 % hasta un 50 % del valor de la media del parámetro, se hizo esto con las 3 configuraciones. Los resultados para todas las configuraciones se muestran en la figura 4.10.



Figura 4.10: Comportamiento de la sincronización al tomar en cuenta la variabilidad celular. a) Configuración T-T. b) Configuración PV. c) Configuración Hex.

Después de analizar los resultados obtenidos al variar todos los parámetros, se observa que en ningún momento se logra la sincronización con ninguna de las configuraciones. Por lo tanto se procedió a hacer un estudio de sensibilidad de parámetros. Para esto, la variación de los parámetros se hizo de uno a la vez, para identificar con respecto a que parámetros el modelo presenta mayor sensibilidad. Se detecto que el modelo es muy sensible al parámetro γ_x , ya que con solo variar este parámetro un 0.01 % del valor base, la sincronización se empieza a perder, los resultados se muestran en la figura 4.11. Por esta razón se opto por dejar también este parámetro fijo y realizar el estudio de variabilidad celular al variar solo los parámetros restantes.



Figura 4.11: Análisis de sensibilidad para el parámetro γ_x . a) Configuración T-T. b) Configuración PV. c) Configuración Hex.

Dada la aclaración anterior, se hizo el estudio del comportamiento de la sincronización al considerar la variabilidad celular. En la figura 4.12 se muestran los resultados obtenidos para la configuración de T-T.



Figura 4.12: Comportamiento de la sincronización al tomar en cuenta la variabilidad celular en la configuración T-T.

En la gráfica se puede ver que la sincronización se mantiene para una variabilidad celular del 10 % y 20 %, mientras que para el 30 %, 40 % y 50 %, la sincronización presenta puntos donde se pierde, y ademas muestra una pequeña tendencia a disminuir conforme se incrementa la cantidad de células. Esta perdida de sincronización nos dice que el tener un grupo grande de células con mucha variabilidad entre ellas, y ademas con comunicación directa entre todo el grupo provoca que se dificulte la sincronización.

Ahora analicemos los resultados obtenidos en la configuración para la configuración de PV. Estos resultados se muestran en la figura 4.13.



Figura 4.13: Comportamiento de la sincronización al tomar en cuenta la variabilidad celular en la configuración PV. a) Con un 10% y 20% de variación. b) Con un 30% de variación. c) Con un 40% de variación. d) Con un 50% de variación.

Los resultados obtenidos para esta configuración muestran que cuando se tiene una variación del 10% y 20% prácticamente la sincronización se mantiene, pero a partir del 30% la sincronización presenta algunos puntos donde se pierde. Ademas también podemos ver que la sincronización depende solo de la variación de los parámetros y no de la cantidad de células que se comunican, ya que el parámetro de orden no muestra una tendencia en particular al aumentar la cantidad de células. Esto tiene sentido ya que como mencionamos anteriormente en esta configuración, la comunicación directa es solo con dos células por lo que se debe esperar un comportamiento muy similar en todo el crecimiento de la red.

Continuemos con el análisis de los resultados obtenidos al tomar en cuenta la variabilidad celular en la configuración Hex. Los resultados se muestran en la figura 4.14.



Figura 4.14: Comportamiento de la sincronización al tomar en cuenta la variabilidad celular en la configuración Hex.

En esta configuración los resultado muestran que el modelo presenta una gran robustez, ya que soporta variaciones de hasta el 40% sin que se pierda

la sincronización, incluso para variaciones del 50 %, el valor del parámetro de orden solo muestra un valor menor a 1 en la capa 4.

El resultado obtenido con esta configuración, nos indica que es la más conveniente para mantener la sincronización al considerar la variabilidad celular. Además que en el mundo real, es coherente pensar que las células solo se puedan comunicar con una cantidad limitada de células. Por lo que este resultado valida que la cantidad de células que se pudieran comunicar durante la somitogénesis es la apropiada para darle robustez a la sincronización que caracteriza a este proceso.

Capítulo 5 Conclusiones.

Después de analizar los resultados obtenidos en este proyecto, se puede concluir lo siguiente:

El modelo presenta una gran sensibilidad al parámetro γ_x , por esto se debe esperar que en el proceso de somitogénesis se tenga un control bien regulado de los factores biológicos que están relacionados con este parámetro.

En la configuración de T-T, el aumento en la cantidad de células favorece la sincronización cuando no se toma en cuenta la variabilidad celular, sin embargo al considerar la variabilidad celular, el aumento en la cantidad de células dificulta la sincronización.

En la configuración de PV, el comportamiento que presenta la sincronización es prácticamente independiente de la cantidad de células, ya que para todos los estudios realizados con esta configuración, al aumentar la cantidad de células se obtuvieron resultados muy similares. Sin embargo, en esta configuración, para que las células pudieran llegar a sincronizarse, al considerar la variabilidad celular, es necesario que el parámetro k_h relacionado con la fuerza de conexión tenga un valor fuera de la realidad biológica. La configuración Hex es la que mostró mayor estabilidad en cuanto a la variación de la sincronización en función de la cantidad de células, ya que para todos los análisis realizados el comportamiento para todas las capas fue muy similar, ademas de que para el estudio hecho con variabilidad celular fue la configuración que prácticamente mostró una robustez total, al mantener la sincronización al llegar a una variación del 50%. Este resultado obtenido se puede validar con lo que puede ocurrir en la realidad biológica durante la somitogénesis, ya que es lógico pensar que durante la somitogénesis las células tienen comunicación directa con una cantidad limitada de células vecinas, que muy probablemente sea una cantidad cercana a 6, como en la configuración Hex.

En general la robustez representa un compromiso antagónico entre la cantidad de células y el número de conexiones, ya que como se vio en los resultados, para mantener la sincronización se debe mantener un equilibrio entre estos dos factores, que en las configuraciones estudiadas en este proyecto, este equilibrio se presenta en la configuración Hex.

Capítulo 6 Trabajo a futuro.

Al finalizar este proyecto se obtuvieron resultados interesantes acerca de como se ve afectada la sincronización durante la somitogénesis tomando en cuenta diversas circunstancias, más sin embargo el presente trabajo se puede complementar tomando en cuenta otros factores que intervienen en este proceso, lo que da origen a la posibilidad de continuar con la presente investigación e incluir estudios posteriores sobre lo siguiente:

Considerar el efecto del FGF en un modelo tridimensional.

Esto con el fin de poder elucidar el comportamiento de la sincronización cuando las células del MSP están expuestas a gradientes de concentración de este factor de crecimiento.

Estudiar el efecto de la variabilidad en los retardos.

Dado que en el presente estudio no se consideró que los retardos pudieran variar, resulta interesante estudiar el efecto que estas variaciones pudieran tener en la sincronización.

Estudiar un modelo estocástico.

Esto con el fin de realizar un modelo mas cercano a la realidad, además de

poder determinar si el ruido llegara a favorecer la sincronización como se presenta en algunos osciladores biológicos.

Capítulo 7

Apéndice.

Normalizacion del modelo.

El modelo se desarrolló partiendo del siguiente sistema de ecuaciones diferenciales con retardo:

$$\frac{dm(t)}{dt} = a_m f(p(t-\tau_m)) - b_m m(t)$$
(7.1)

$$\frac{dp(t)}{dt} = a_p m(t - \tau_p) - b_p p(t)$$
(7.2)

donde:

$$f(x) = \frac{k^2}{k^2 + x(t)},$$

ahora si consideramos que la dinámica de la proteína p es mucho mas lenta que la del mensajero m, podemos suponer un estado cuasi-estacionario e igualar a 0 el lado izquierdo de la ecuación 7.1 y despejar m(t). Con lo que nos quedaría lo siguiente:

$$m(t) = \frac{a_m}{b_m} \frac{k^2}{k^2 + p(t - \tau_m)^2},$$
(7.3)

ahora sustituyendo la ecuación 7.3 en la ecuación 7.2, nos queda:

$$\frac{dp(t)}{dt} = \frac{a_p a_m}{b_m} \frac{k^2}{k^2 + p(t - \tau_m - \tau_p)} - b_p p(t),$$
(7.4)

Tomando $\tau_T = \tau_m + \tau_p$, de acuerdo a 7.4 obtenemos la siguiente ecuación para describir el comportamiento de la proteína:

$$\frac{dp(t)}{dt} = \frac{a_p a_m}{b_m} \frac{k^2}{k^2 + p(t - \tau_T)} - b_p p(t).$$
(7.5)

En la ecuación 7.5, vemos conveniente usar τ_T como tiempo característico, esto es cambiamos la escala de tiempo con el siguiente cambio de variable

$$\hat{t} = \frac{t}{\tau_T} \tag{7.6}$$

y considerando su derivada respecto a al escala temporal original tenemos

$$\frac{d\hat{t}}{dt} = \frac{1}{\tau_T} \tag{7.7}$$

luego para expresar la ecuación 7.5 en términos de \hat{t} , aplicamos la regla de la cadena

$$\frac{dp(t)}{dt} = \frac{d\hat{t}}{dt} \frac{dp(t)}{d\hat{t}} = \frac{1}{\tau_T} \frac{dp(t)}{d\hat{t}}, \qquad (7.8)$$

sustituyendo la ecuación 7.8 y 7.6 en la ecuación 7.5 tenemos

$$\frac{1}{\tau_T} \frac{dp(\tau_T \hat{t})}{d\hat{t}} = \frac{a_p a_m}{b_m} \frac{k^2}{k^2 + p(\tau_T \hat{t} - \tau_T)} - b_p p(\tau_T \hat{t}),$$
(7.9)

despejando $dp(\tau_T \hat{t})/d\hat{t}$ y simplificando de 7.4 vemos que

$$\frac{dp(\tau_T \hat{t})}{d\hat{t}} = \frac{\tau_T a_p a_m}{b_m} \frac{k^2}{k^2 + p(\tau_T (\hat{t} - 1))} - \tau_T b_p p(\tau_T \hat{t}),$$
(7.10)

pero dado que ahora τ_T tienen un valor de una unidad de nuestra nueva escala de tiempo, entonces de la ecuación 7.10 obtenemos la nueva ecuación con el cambio de escala en el tiempo, dada por:

$$\frac{dp(\hat{t})}{d\hat{t}} = \frac{\tau_T a_p a_m}{b_m} \frac{k^2}{k^2 + p((\hat{t} - 1))} - \tau_T b_p p(\hat{t}).$$
(7.11)

Normalizando respecto al valor maximo del lado derecho de 7.11 y factorizando $\tau_T b_p$ obtenemos

$$\frac{dp(\hat{t})}{d\hat{t}} = \tau_T b_P \left\{ \frac{a_p a_m}{b_p b_m} \frac{k^2}{k^2 + p((\hat{t} - 1))} - p(\hat{t}) \right\}$$
(7.12)

Por claridad usaremos la siguiente notación

$$P = \frac{p}{\frac{a_p a_m}{b_p b_m}} \tag{7.13}$$

$$\gamma_p = \tau_T b_p \tag{7.14}$$

$$K = \frac{k}{\frac{a_p a_m}{b_p b_m}} \tag{7.15}$$

sustituyendo 7.13, 7.14 y 7.15 en 7.12 se llega a:

$$\frac{dP(\hat{t})}{d\hat{t}} = \gamma_p \left[\frac{K^2}{K^2 + P(\hat{t} - 1)^2} - P(\hat{t}) \right]$$
(7.16)

recordando la definición de f,ahora en la nueva notación tenemos

$$f(P(\hat{t}-1)) = \frac{K^2}{K^2 + P(\hat{t}-1)}$$

entonces la ecuación 7.16 se puede escribir como:

$$\frac{dP(\hat{t})}{d\hat{t}} = \gamma_p \left[f(P(\hat{t}-1)) - P(\hat{t}) \right]$$
(7.17)

Modelos usados en las simulaciones. Modelo utilizado en la configuracion T-T.

Para la configuración T-T las células tienen comunicación con todas sus vecinas. Supongamos que tenemos n células en la configuración T-T; así pues la ecuación diferencial con retardo para la i-ésima célula tiene la forma

$$\frac{dx_i(t)}{dt} = \gamma_{x_i} \left[f(x_i(t-1))e\left(\sum_{\substack{j=1\\j\neq i}}^n y_j(t-1)\right) - x_i(t) \right],\\ \frac{dy_i(t)}{dt} = \gamma_{y_i} \left[h(x_i(t-\tau_y)) - y_i(t) \right], \quad i = 1, 2, ..., n.$$

Modelo para la configuración PV.

Para el caso de la configuración PV, las células tienen comunicación directa con sus correspondientes primeras vecinas. De tal forma que la célula i esta conectada con las células i - 1 e i + 1, i = 1, 2, ..., n. Para el caso de la célula 1, la conexión la tiene con la células $n \ge 2$, ≥ 1 la célula n esta conectada con la célula $n - 1 \ge 1$. Así pues el modelo correspondiente a esta configuración tiene la forma

caso i = 1

$$\frac{dx_1(t)}{dt} = \gamma_{x_1} \left[f(x_1(t-1))e(y_n(t-1) + y_2(t-1)) - x_1(t) \right],
\frac{dy_1(t)}{dt} = \gamma_{y_1} \left[h(x_1(t-\tau_y)) - y_1(t) \right],$$

caso i = 2, 3, ..., n - 1

$$\frac{dx_i(t)}{dt} = \gamma_{x_i} \left[f(x_i(t-1))e(y_{i-1}(t-1) + y_{i+1}(t-1)) - x_i(t) \right]
\frac{dy_i(t)}{dt} = \gamma_{y_i} \left[h(x_i(t-\tau_y)) - y_i(t) \right]$$

y caso i = n

$$\frac{dx_n(t)}{dt} = \gamma_{x_n} \left[f(x_n(t-1))e(y_{n-1}(t-1) + y_1(t-1)) - x_n(t) \right],
\frac{dy_n(t)}{dt} = \gamma_{y_n} \left[h(x_n(t-\tau_y)) - y_n(t) \right].$$

Modelo para la configuración Hex.

Aquí consideramos que cada célula puede tener comunicación con máximo 6 células vecinas. Sea N_i el conjunto de índices para los cuales la célula i se conecta con alguna célula $j \in N_i$. De acuerdo a esta notación tenemos.

$$\frac{dx_i(t)}{dt} = \gamma_{x_i} \left[f(x_i(t-1))e\left(\sum_{j \in N_i} y_j(t-1)\right) - x_i(t) \right]$$
$$\frac{dy_i(t)}{dt} = \gamma_{y_i} \left[h(x_i(t-\tau_y)) - y_i(t) \right]$$

Nota: N indica el número de vecinas que tiene cada célula, que puede ser un máximo de 6, este número varia para las células de la última capa, ya que en este caso N toma un valor menor.

Bibliografía

- M. Maroto, R. A. Bone, and J. K. Dale. Somitogenesis. *Development*, 139(14):2453–2456, 2012.
- [2] Laurel A. Rohde and Carl Philipp Heisenberg. Zebrafish Gastrulation: Cell Movements, Signals, and Mechanisms. *International Review of Cy*tology, 261(07):159–192, 2007.
- [3] Salder T.W. Langman's Medical Embriology . 2012.
- [4] Yukiko Harima and Ryoichiro Kageyama. Oscillatory links of Fgf signaling and Hes7 in the segmentation clock. *Current Opinion in Genetics* and Development, 23(4):284–290, 2013.
- [5] J. Cooke and E. C. Zeeman. A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *Journal* of Theoretical Biology, 58(2):455–476, 1976.
- [6] Gilbert F Scott. Developmental Biology. 2003.
- [7] Bruce M Carlson. Human Embryology and Developmental Biology. 2014.
- [8] C Gomez, E M Ozbudak, J Wunderlich, D Baumann, J Lewis, and O Pourquie. Control of segment number in vertebrate embryos. *Nature*, 454(7202):335–339, 2008.

- [9] Julian Lewis. Autoinhibition with Transcriptional Delay. Current Biology, 13(16):1398–1408, aug 2003.
- [10] Ertugrul M. Ozbudak and Julian Lewis. Notch signalling synchronizes the zebrafish segmentation clock but is not needed to create somite boundaries. *PLoS Genetics*, 4(2), 2008.
- [11] Sarah Bray. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Molecular Cell Biology, (7):678–689, sep 2006.
- [12] Emma R Andersson and Urban Lendahl. Therapeutic modulation of Notch signalling-are we there yet? Nature reviews. Drug discovery, 13(5):357-78, 2014.
- [13] Y J Jiang, B L Aerne, L Smithers, C Haddon, D Ish-Horowicz, and J Lewis. Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock. *Nature*, 408(6811):475–479, 2000.
- [14] Michael P Bulman, Kenro Kusumi, Timothy M Frayling, Carole Mckeown, Christine Garrett, Eric S Lander, Robb Krumlauf, Andrew T Hattersley, Sian Ellard, and Peter D Turnpenny. Mutations in the human Delta homologue, Dll3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nature Amenrica Inc.*, 24(april):438–441, 2000.
- [15] Christian Schröter, Saúl Ares, Luis G. Morelli, Alina Isakova, Korneel Hens, Daniele Soroldoni, Martin Gajewski, Frank Jülicher, Sebastian J. Maerkl, Bart Deplancke, and Andrew C. Oates. Topology and dynamics of the zebrafish segmentation clock core circuit. *PLoS Biology*, 10(7):11, 2012.
- [16] Ahmet Ay, Stephan Knierer, Adriana Sperlea, Jack Holland, and Ertuğrul M Özbudak. Short-lived Her proteins drive robust synchronized

oscillations in the zebrafish segmentation clock. *Development (Cambrid-ge, England)*, 140:3244–53, 2013.

- [17] Didier Gonze, Samuel Bernard, Christian Waltermann, Achim Kramer, and Hanspeter Herzel. Spontaneous synchronization of coupled circadian oscillators. *Biophysical journal*, 89(1):120–9, 2005.
- [18] Jordi Garcia-Ojalvo, Michael B Elowitz, and Steven H Strogatz. Modeling a synthetic multicellular clock: repressilators coupled by quorum sensing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(30):10955–60, 2004.