



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

**Unidad Zacatenco
Departamento de Control Automático**

**Análisis de controlabilidad de la red de regulación genética de
la transición epitelio-mesénquima en el desarrollo del cáncer
epitelial.**

Tesis que presenta

Jorge Enrique Narváez Chávez

Para Obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

En la Especialidad de

Control Automático

Director de Tesis

Dr. Juan Carlos Martínez García

*Dedicado a mi familia,
quienes me han brindado todo su amor y apoyo.*

Agradecimientos

Agradezco infinitamente al Dr. Juan Carlos Martínez García, cuya idea original, guía y asesoramiento me permitieron lograr los resultados del presente trabajo, él cual no sería posible sin su total apoyo y comprensión dentro y fuera del ámbito académico.

Agradezco enormemente al Dr. Moisés Bonilla Estrada y al Dr. Alberto Soria López, por sus comentarios y su valiosa ayuda para completar esta tesis.

Agradezco también a los profesores que me impartieron cátedra, especialmente a los del Departamento de Control Automático, cuya contribución a mi formación académica fue fundamental. También quiero agradecer a los profesores y alumnos de posgrado que me apoyaron en la introducción al mundo académico de la biología, principalmente a los del Centro de Ciencias de la Complejidad de la UNAM y la Universidad Autónoma de Morelos.

Agradezco a Luis Fernando Méndez López, José Dávila Velderrain, Christian Enriquez Olguín, Juan Carlos Martínez García y Elena Alvarez Buylla, autores del artículo en el cual se presenta la red de regulación de la transición epitelio-mesénquima, el cual a la luz de los resultados del presente prueba ser de gran calidad.

Agradezco especialmente a mi familia, a mis padres Sofía y Jorge por su apoyo durante toda mi formación, a mis hermanos Sofía, Luis y Fernanda por su cariño y apoyo, especialmente a Sofía por su valiosa ayuda con los temas médicos y biológicos concernientes al presente trabajo, a mi tía Syomara, cuyo apoyo me permitió ingresar a la maestría, a mi novia Leoneli quien compartió sus conocimientos biológicos y médicos, además de muy valiosas pláticas que me permitieron comprender los alcances del presente trabajo.

Finalmente agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindando durante los dos años de posgrado y al personal del CINVESTAV por todo el apoyo prestado durante mis estudios.

Índice general

Índice general	v
Índice de figuras	vii
1 Preliminares teóricos	3
1.1. Introducción	3
1.2. Biología celular	3
1.3. Red de regulación genética de la transición Epitelio-Mesenquima (TEM) . . .	4
1.3.1. Análisis usando R y GinSIM	7
1.3.2. Análisis usando MATLAB	9
1.4. Producto semi-tensor	9
1.4.1. Matriz de intercambio	10
1.4.2. Forma matricial de expresiones lógicas	11
1.5. Dinámica de redes Booleanas	12
1.6. Resumen	14
2 Análisis de propiedades estructurales de alcanzabilidad	15
2.1. Introducción	15
2.2. Redes de control Booleanas	15
2.2.1. Conjunto de alcanzabilidad	16
2.2.2. Matriz de controlabilidad	17
2.3. Análisis de la red y resultados	18
2.3.1. Trayectorias posibles	18
2.3.2. Trayectoria mesenquimal-epitelial	22
2.4. Simulación computacional de mutantes	23
2.4.1. Módulo <i>Snai2</i>	23
2.4.2. Módulo <i>ESE2</i>	23
2.4.3. Módulo <i>p16</i>	24

2.4.4. Módulo <i>E2F</i>	24
2.4.5. Módulo <i>Cyclin</i>	24
2.4.6. Módulo <i>TELas</i>	24
2.4.7. Módulo <i>NFkβ</i>	24
2.4.8. Módulo <i>Rb</i>	24
2.4.9. Módulo <i>p53</i>	25
2.5. Resumen	25
3 Interpretación de los resultados	27
3.1. Introducción	27
3.2. Importancia del módulo <i>ESE2</i>	28
3.3. Importancia del módulo <i>Snai2</i>	28
A Diagramas de mutantes	33
A.1. Mutantes con control ignorando la dinámica	33
A.2. Mutantes con control AND	41
B Códigos	51
Bibliografía	53

Índice de figuras

1.1. Diagrama de la red.	6
1.2. Atractores encontrados con Boolnet en R. Los atractores corresponden de izquierda a derecha al estado celular Epitelial, Mesenquimal y Senescente. En rojo se representan los módulos inactivos y en verde los activos.	7
1.3. Diagrama de las cuencas de atracción obtenido con BoolNet.	8
1.4. Diagrama de la red en GinSIM.	9
1.5. Atractores encontrados en GinSIM usando simulación síncrona.	9
2.1. Diagrama usando regla OR: Se puede observar que una vez en el estado mesenquimal ya no es posible salir de él. Existe un control a través de TELasa que puede llevar del estado senescente al epitelial.	19
2.2. Diagrama usando regla AND: Es posible mover el sistema del estado mesenquimal al epitelial a través del nodo <i>Snai2</i> . Además existe una trayectoria del estado senescente al epitelial a través de <i>p16</i>	20
2.3. Diagrama ignorando la dinámica: La mayoría de las trayectorias resultan de la unión de los resultados anteriores. Las nuevas trayectorias se intuye requieren de un control más fuerte, es decir, controlar totalmente el encendido y apagado del módulo de manera precisa para poder modificar el estado del sistema.	21
2.4. Control u_1: se muestra la transición en el estado del sistema (en forma escalar, de acuerdo a las conversiones del método) y la secuencia de control (en forma binaria).	22
2.5. Control u_2: se muestra la transición en el estado del sistema (en forma escalar) y la secuencia de control (en forma binaria).	23
A.1. Trayectorías posibles apagando <i>Snai2</i>	33
A.2. Trayectorías posibles encendiendo <i>Snai2</i>	34
A.3. Trayectorías posibles apagando <i>ESE2</i>	34
A.4. Trayectorías posibles encendiendo <i>ESE2</i>	34
A.5. Trayectorías posibles apagando <i>p16</i>	35

A.6. Trayectorías posibles encendiendo <i>p16</i>	35
A.7. Trayectorías posibles apagando <i>E2F</i>	35
A.8. Trayectorías posibles encendiendo <i>E2F</i>	36
A.9. Trayectorías posibles apagando <i>Cyclin</i>	36
A.10. Trayectorías posibles encendiendo <i>Cyclin</i>	37
A.11. Trayectorías posibles apagando <i>TELasas</i>	37
A.12. Trayectorías posibles encendiendo <i>TELasas</i>	38
A.13. Trayectorías posibles apagando <i>NFkB</i>	38
A.14. Trayectorías posibles encendiendo <i>NFkB</i>	39
A.15. Trayectorías posibles apagando <i>Rb</i>	39
A.16. Trayectorías posibles encendiendo <i>Rb</i>	40
A.17. Trayectorías posibles apagando <i>p53</i>	40
A.18. Trayectorías posibles encendiendo <i>p53</i>	40
A.19. Trayectorías posibles apagando <i>Snai2</i>	41
A.20. Trayectorías posibles encendiendo <i>Snai2</i>	41
A.21. Trayectorías posibles apagando <i>ESE2</i>	42
A.22. Trayectorías posibles encendiendo <i>ESE2</i>	42
A.23. Trayectorías posibles apagando <i>p16</i>	42
A.24. Trayectorías posibles encendiendo <i>p16</i>	43
A.25. Trayectorías posibles apagando <i>E2F</i>	43
A.26. Trayectorías posibles encendiendo <i>E2F</i>	44
A.27. Trayectorías posibles apagando <i>Cyclin</i>	44
A.28. Trayectorías posibles encendiendo <i>Cyclin</i>	45
A.29. Trayectorías posibles apagando <i>TELasas</i>	45
A.30. Trayectorías posibles encendiendo <i>TELasas</i>	46
A.31. Trayectorías posibles apagando <i>NFkB</i>	46
A.32. Trayectorías posibles encendiendo <i>NFkB</i>	47
A.33. Trayectorías posibles apagando <i>Rb</i>	47
A.34. Trayectorías posibles encendiendo <i>Rb</i>	48
A.35. Trayectorías posibles apagando <i>p53</i>	48
A.36. Trayectorías posibles encendiendo <i>p53</i>	49

Resumen

En esta tesis se estudia la red de regulación genética que subyace a la Transición Epitelio Mesénquima en el contexto del cáncer epitelial. Dicha red de regulación es modelada, con base en datos experimentales, mediante una red Booleana discreta. La red Booleana es transformada a una forma algebraica mediante el uso del producto semi-tensor. Se exploran las características estructurales de la red. Se analizan las propiedades de controlabilidad y alcanzabilidad, obteniendo representaciones gráficas de las trayectorias posibles. Se obtiene un controlador de lazo abierto por secuencia libre para realizar una transición Mesénquima-Epitelio (TME), presentado a través de una simulación. Finalmente se presenta la interpretación biológica de los resultados teóricos, sustentada con evidencia experimental independiente para los nodos más influyentes en la dinámica de la TEM y la TME.

Summary

In this dissertation the gene regulatory network underlying the Mesenchymal-Epithelial Transition in the epithelial cancer context is studied. Such regulatory network is modelled, supported by experimental data, by a discrete Boolean network. The Boolean network is transformed into an algebraic form through the use of a semi-tensor product approach. Structural features of the network are explored. Controllability and Reachability properties are analyzed, generating graphic representations of possible trajectories. An free Boolean sequence open-loop controller to force a Mesenchymal-Epithelial Transition (MET) is obtained and presented in a simulation. Finally, a biological interpretation of the theoretical results is introduced, supported by independent experimental evidence for the most influent nodes in the EMT and MET dynamics.

Introducción

El estudio de los sistemas biológicos es muy importante debido a las diversas aplicaciones de alto impacto que pueden ser desarrolladas a partir de su análisis y experimentación. Dichas aplicaciones incluyen por supuesto las médicas.

Uno de los temas de estudio más importantes en el ámbito médico es el cáncer, término que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo, cuya característica principal es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales en un proceso denominado metástasis.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, tan sólo en 2008 ocasionó 8.8 millones de muertes y se estima que casi una de cada seis muertes a nivel mundial son ocasionadas por éste [19]. Alrededor del 84 % de los casos de cáncer diagnosticados en adultos son de origen epitelial, denominados carcinomas. La transformación tumorigena de células epiteliales humanas ha sido descrita como el resultado de un proceso llamado *inmortalización espontánea*, proceso en el cual a partir de una serie de transiciones de estados celulares una célula epitelial normal, adquiere el fenotipo, es decir expresa una porción de su información genética, de un estado senescente mesenquimal. Este proceso de transición es conocido como la Transición Epitelio-Mesenquima (TEM)

El proceso de transiciones de estado (celular) de una célula epitelial humana, fue analizado en [12], en el cual a partir de una extensa revisión bibliográfica de resultados experimentales y datos sobre sus componentes moleculares e interacciones que han sido descritos como reguladores clave de los estados celulares y sus transiciones. Como resultado se obtuvo una GRN (*Gene Regulatory Network* o Red de Regulación Genética). Las redes de regulación genéticas modelan las distintas interacciones moleculares y bio-moleculares para la expresión génica, y surgen a partir del trabajo de Jacob y Monod [9], quienes mostraron que las células tienen un conjunto de genes reguladores, lo cuales pueden ser activados (reprimidos) o desactivados (inducidos) por algunas moléculas específicas.

El modelado Booleano de la dinámica de las redes de regulación genética, surge a partir de las ideas

de Kauffman [10], quien realizó un estudio de redes interruptores (encendido-apagado) generadas de manera aleatoria tanto en su topología (conexiones entre nodos) como en sus interacciones (funciones lógicas de un nodo en función de otros), sentando con ello las bases para el análisis de redes de regulación genética mediante aproximaciones Booleanas.

A través del producto semi-tensor, el cual es una generalización del producto matricial tradicional, que permite multiplicar matrices de dimensiones no compatibles bajo las reglas tradicionales, se puede obtener una representación algebraica en el espacio de estados (ASSR: *Algebraic State Space Representation*) a partir de las funciones lógicas que describen la dinámica de una red Booleana. Esta representación puede ser usada para analizar las propiedades de la red (puntos de equilibrio (atractores), ciclos límite, controlabilidad, observabilidad, etc) [5; 6]. Es importante recalcar que dado que la dimensión del espacio de estados es 2^n donde n es la cantidad de nodos, al aumentar el número de nodos la complejidad computacional aumenta de manera exponencial.

En este trabajo se utilizan los métodos presentados en [6], para analizar el núcleo de la red que describe la transición TEM y así obtener las propiedades de controlabilidad y alcanzabilidad de la red y dilucidar bajo los supuestos de la teoría de control si de acuerdo a estos modelos es posible controlar los estados celulares que forman parte de ésta dinámica, y de ser así, a través de que nodos es posible controlar dichas transiciones.

Preliminares teóricos

1.1. Introducción

En este capítulo se presentan conceptos básicos de biología celular y una descripción simplificada del funcionamiento celular, dichos conceptos y descripciones permitirán tener las nociones básicas para el entendimiento de la red de regulación genética que controla la Transición Epitelio-Mesénquima, cuya descripción y orígenes se describen en el presente capítulo. Se presentan además las bases teóricas del producto semi-tensor y de la dinámica de redes Booleanas.

1.2. Biología celular

Los procesos vitales de las células que componen a los distintos organismos, unicelulares y pluricelulares, se rigen por el «Dogma Central de la Biología», el cual se puede describir como el siguiente proceso [7]:

1. El Ácido Desoxirribonucleico (ADN) funciona como el almacenamiento a largo plazo.
2. Las proteínas se construyen usando el ADN como plantilla.
3. Para construir una proteína una sección correspondiente del ADN, llamado gen, es transcrito en una molécula llamada ARN mensajero (ARNm).
4. El ARNm es traducido en una proteína por un complejo molecular llamado ribosoma.

Si se hiciera una analogía entre un programa computacional y el dogma central de la biología se podría decir que, el ADN es un programa, el cual es ejecutado por la transcripción a ARNm y su expresión como una proteína [7]. Después de que una proteína es fabricada, se dice que el gen está expresado, además a las moléculas codificadas por un gen se les llama productos génicos.

Las proteínas llevan a cabo la mayor parte de la actividad celular, incluyendo el control o regulación de la transcripción, traducción y replicación del ADN.

Las distintas células que forman un organismo pluricelular comparten el mismo ADN, pero están diferenciadas, es decir que expresan un conjunto diferente de genes. Al proceso que controla la activación de un subconjunto de genes se le llama regulación genética [15]. Dicha regulación puede llevarse a cabo en distintos momentos del proceso de expresión genética tales como en la transcripción, previo al procesamiento del ARNm, en la traducción, post-traducción, etc.

Cuando la regulación ocurre durante la transcripción se le denomina regulación transcripcional, la cual es mediada por proteínas llamadas factores de transcripción (FT). Los factores de transcripción se unen a una secuencia corta específica de ADN llamada sitio/lugar de unión (*Binding Sites, BS*) o sitios de unión para factores de transcripción (*Transcription Factor Binding Site, TFBS*), dichos sitios están localizados usualmente en la región relacionada al gen conocida como promotor, la cual cabe destacar no se encuentra necesariamente adyacente o cerca de este.

Cada FT puede regular distintos genes y puede servir como *activador*, es decir que aumenta el nivel de transcripción de un gen regulado, o como *represor*, el cual decrementa el nivel de transcripción.

Existen dos formas principales de activación [15]:

1. El FT se une al promotor del gen e interactúa con los componentes del ARN, de manera que atrae moléculas de ARN a la vecindad del promotor, facilitando así su unión al promotor.
2. El FT modifica la estructura de la región del promotor, haciéndola así más accesible al ARN.

A su vez, existen también dos formas principales de represión:

1. El represor compite con un FT activador en los sitios de unión, de manera que reduce la eficiencia de la unión del ARN al promotor, resultando en una menor expresión del gen.
2. El represor interactúa con los mismos componentes del ARN que el FT activador, de manera que evita que el activador interactúe con el ARN y promueva la transcripción.

1.3. Red de regulación genética de la transición Epitelio-Mesenquima (TEM)

En el presente trabajo se tratan distintos fenotipos celulares, los cuales se describen a continuación [12].

- **Epitelial:** Son células que aparecen de forma temprana en el desarrollo embrionario, siendo el primer tipo identificable en un embrión. En los adultos estas células constituyen la mayoría de superficies y cavidades de los órganos.
- **Mesenquimal:** Proveen soporte y estructura a las células epiteliales, particularmente mediante la producción de una matriz extracelular, es decir el conjunto de moléculas y materiales extracelulares que proveen de soporte estructural y bioquímico a las células que forman parte de un tejido.

Las células mesenquimales no forman capas regulares de células o complejos especializados de adhesión intercelular. Éstas células son esenciales durante el desarrollo embrionario.

- **Mesenquimal con características embrionarias:** Son células epiteliales inducidas por una TEM debida a un proceso inflamatorio. Dentro de las características de estas células están la inmortalidad, evasión del sistema inmune, migración, resistencia a la apoptosis y la habilidad de traslaparse a nivel transcripcional y funcional con células madre cancerígenas e iniciadoras de tumores.
- **Senescente:** La senescencia puede ser causada por el acortamiento de telómeros debido a una repetida división celular, este proceso es llamado senescencia replicativa. Las células afectadas sufren diversos cambios, entre estos, un incremento en el tamaño celular y una forma aplanada, pérdida de interacciones célula-célula, apariencia vacuolada (vacuolas o cavidades) y reorganización de la cromatina (estructura en la cuál se presenta el ADN, ARN y proteínas dentro de la célula). La expresión genética es afectada de manera importante, por lo cual éste estado celular es considerado un estado de destino celular, de manera que distintos tipos celulares pueden converger a este fenotipo.

La transición epitelio-mesénquima (**TEM**) es un proceso biológico en el que una célula epitelial sufre múltiples cambios bioquímicos que le permiten obtener un fenotipo mesenquimal, el cual incluye las características descritas con anterioridad. Los signos de que la TEM ha sido completada son la degradación de la membrana basal y la formación de una célula mesenquimal que puede emigrar de la capa epitelial en la cual se originó. Aunque inicialmente se consideraba que la TEM era irreversible, se ha observado la transición Mesénquima-Epitelio (TME), aunque sabe poco acerca de este proceso, inverso a TEM, se ha asociado con la formación renal en embriones.

A través de una extensa revisión bibliográfica de artículos y bases de datos con resultados experimentales en el trabajo de [12] se propuso una red de 41 nodos, la cual modela la dinámica entre 12 FT (factores de transcripción) y 29 moléculas de señalización, que incluye 97 interacciones. En el mismo trabajo, se realizó una reducción basada en conocimiento para derivar un núcleo GRN para el cual se establecieron funciones lógicas bien definidas. Éste núcleo contiene el conjunto necesario y suficiente que permite reproducir el conjunto restringido de estados celulares y transiciones temporalmente ordenadas, entre ellas la inmortalización espontánea y le emergencia y progresión de cáncer epitelial. El núcleo de la red de regulación presentado por Méndez-López et al. [12] (figura 1.1), consta de nueve nodos (módulos) los cuales se describen a continuación:

- **ESE-2:** Representa la actividad de los factores de transcripción ESE-1, ESE-2 y ESE-3. ESE-2 se considera como un supresor de tumores y también es conocido como *ELF5*.
- **p16:** Representa la actividad de INK4b-ARF-IN4a, que codifica las proteínas p16 y p14. La senescencia celular está caracterizada molecularmente por la expresión de dichas proteínas.
- **p53:** Representa la proteína con el mismo nombre. El acortamiento de ADN telomérico parece ser reconocido como daño de ADN promoviendo la activación de p53.

- **Rb**: Representa el regulador de ciclo celular retinoblastoma. Rb evita la progresión del ciclo al formar un complejo con el FT E2F.
- **E2F**: Representa el FT del mismo nombre. E2F regula genes críticos para el adecuado progreso del ciclo celular.
- **Cyclin**: Representa la actividad del complejo de quinasas dependiente de ciclina (CDK). Se sabe que inactivan a Rb por fosforilación, lo que a su vez activa E2F y la progresión del ciclo celular.
- **NF- κ B**: Representa la inflamación celular por la actividad del factor de transcripción NF- κ B.
- **TELasa**: Representa la enzima telomerasa. Esta enzima es responsable de sintetizar telómeros «nuevamente».
- **Snai2**: Representa la actividad de los principales FT que, se sabe, están directamente asociados con la regulación de la TEM. Siendo estos: Snai2 (Slug), Snail, Twist1, Twist2, ZEB1, ZEB2 y FOXC2. Estos factores de transcripción reprimen/inducen la expresión de genes específicos de células epiteliales/mesenquimales.

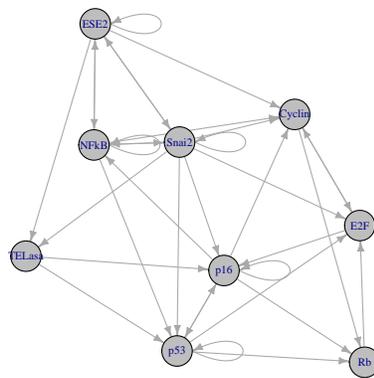


Figura 1.1: Diagrama de la red.

La dinámica de las interacciones de los nodos anteriormente descritos queda plasmada en un modelo Booleano cuyas reglas lógicas simplificadas con la ayuda del software *Mathematica* se muestran en la tabla 1.1.

Nodo	Función lógica
Snai2	$(Snai2 \wedge NFkB) \vee \neg ESE2$
ESE2	$\neg Snai2 \vee (ESE2 \wedge \neg NFkB)$
p16	$(E2F \wedge p16) \vee (p16 \wedge \neg Snai2) \vee (p53 \wedge \neg Snai2) \vee (p53 \wedge \neg TELasa)$
E2f	$\neg p53 \wedge \neg Snai2 \wedge \neg Rb$
Cyclin	$(\neg Snai2 \wedge \neg p16) \vee (\neg ESE2 \wedge \neg p16 \wedge NFkB)$
TELasa	$\neg ESE2$
NFkB	$Snai2 \vee ESE2 \vee p16 \vee NFkB$
Rb	$p53 \vee (p16 \wedge Cyclin)$
p53	$(\neg Snai2 \wedge p16 \wedge \neg TELasa) \vee (\neg Snai2 \wedge \neg TELasa \wedge \neg NFkB)$

Cuadro 1.1: Reglas lógicas de interacción de la red.

1.3.1. Análisis usando R y GinSIM

La red descrita fue analizada usando las herramientas de software **R** [14] (lenguaje y entorno para cómputo estadístico y la generación de gráficas) con la librería **Boolnet** [13] (un paquete para R que provee métodos para reconstruir, generar, graficar y analizar redes Booleanas) y **GinSIM** [4] (una herramienta computacional para el modelado y simulación de redes de regulación genética), obteniéndose los siguientes resultados.

Los atractores encontrados en R usando Boolnet (código B.2) se muestran en la figura 1.2. En el caso del punto fijo correspondiente al estado celular epitelial, la cuenca de atracción es de 92 estados, el correspondiente al estado mesenquimal tiene una cuenca de 288 estados y el correspondiente al estado senescente tiene una cuenca de 132 estados.

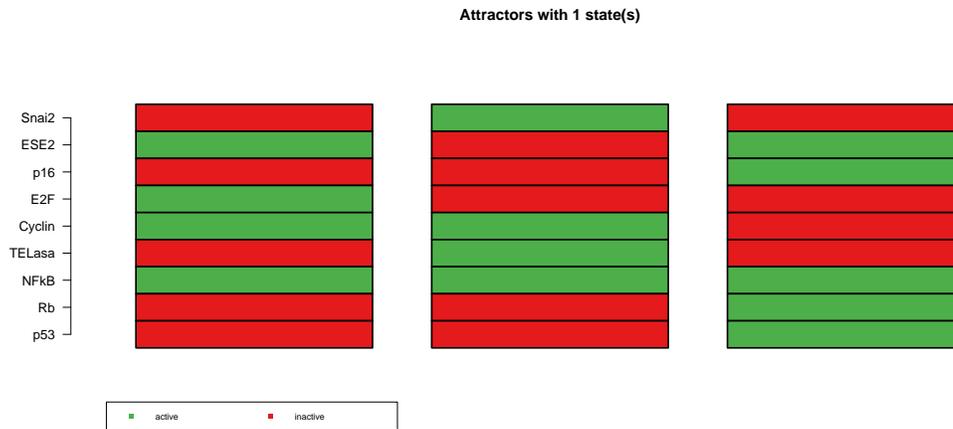


Figura 1.2: Atractores encontrados con Boolnet en R. Los atractores corresponden de izquierda a derecha al estado celular Epitelial, Mesenquimal y Senescente. En rojo se representan los módulos inactivos y en verde los activos.

En el caso del análisis usando GinSIM la red se muestra en la figura 1.4, y los atractores encontrados

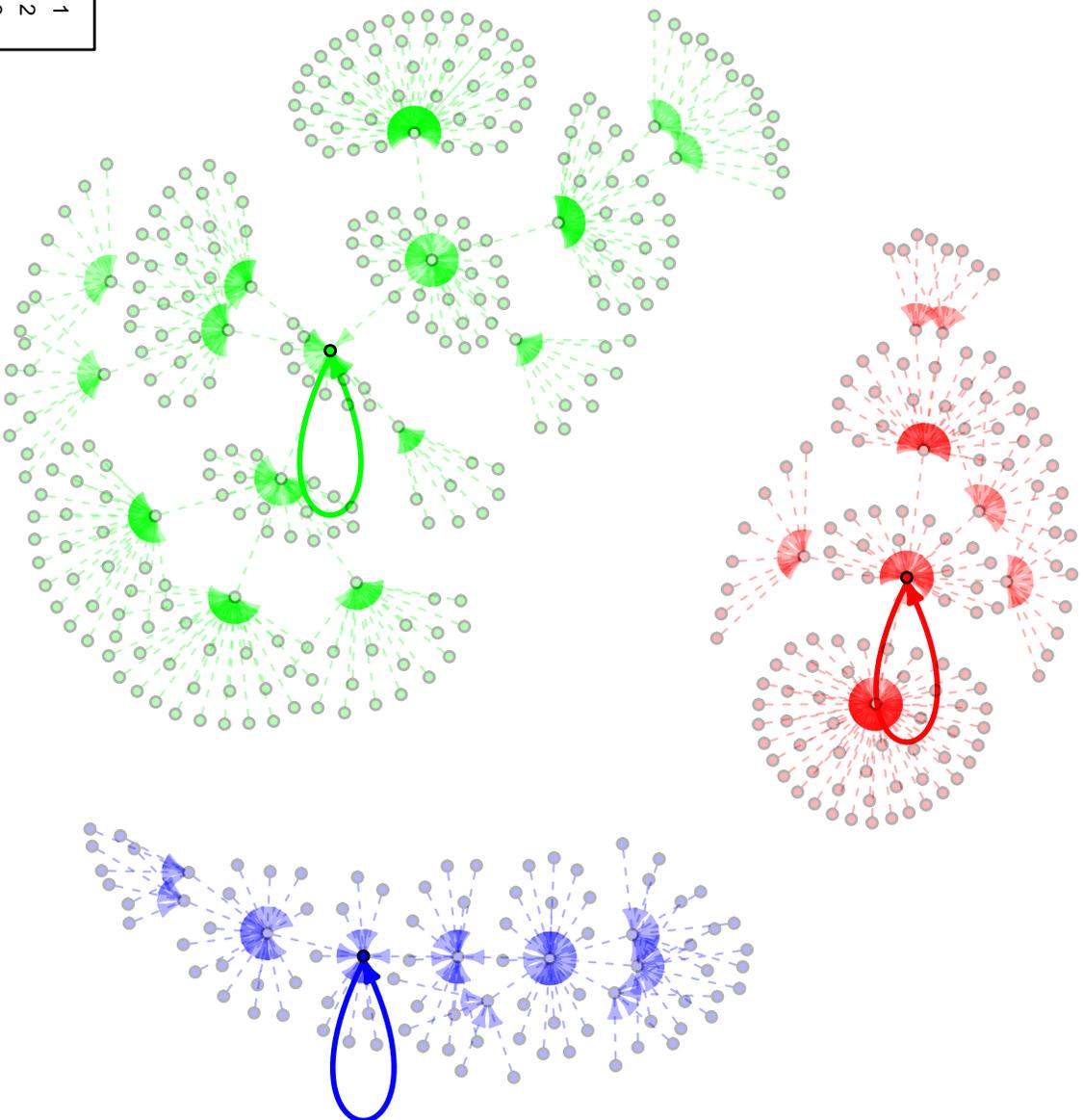
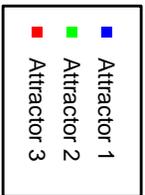


Figura 1.3: Diagrama de las cuencas de atraccion obtenido con BoolNet.

(figura 1.5) coinciden con los encontrados en R.

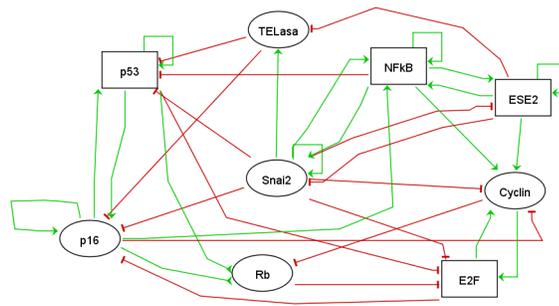


Figura 1.4: Diagrama de la red en GinSIM.

	Snai2	ESE2	p16	E2F	Cyclin	TELasa	NFkB	Rb	p53
Snai2	1								
ESE2	1	1							
p16			1	1					
E2F				1	1	1			
Cyclin					1	1	1		
TELasa						1	1		
NFkB							1	1	1
Rb								1	1
p53									1

Figura 1.5: Atractores encontrados en GinSIM usando simulación síncrona.

1.3.2. Análisis usando MATLAB

Se realizó el análisis de la red de regulación genética usando el herramental del producto semi-tensor (*Toolbox STP*), facilitado por [6], con el código B.1, mediante el cual se obtuvieron los siguientes atractores de punto fijo.

Atractor / Nodo	Snai2	ESE2	p16	E2F	Cyclin	TELasa	NFkB	Rb	p53
Normal	0	1	0	1	1	0	1	0	0
Senescente	0	1	1	0	0	0	1	1	1
Mesenquimal	1	0	0	0	1	1	1	0	0

Cuadro 1.2: Atractores de punto fijo obtenidos con MATLAB.

1.4. Producto semi-tensor

El producto semi-tensor es una generalización del producto convencional matricial que permite la operación con matrices que no cumplen la condición de dimensión del producto convencional mientras cumplan una condición de múltiplo de la dimensión, la presente sección está basada en el trabajo de [6].

Definición 1.4.1 Sea $A \in \mathcal{M}_{m \times n}$, $B \in \mathcal{M}_{p \times q}$ y $\alpha = \text{mcm}(n, p)$ el mínimo común múltiplo de n y p . El producto semi-tensor por la izquierda de A y B está definido como:

$$A \ltimes B = (A \otimes I_{\frac{\alpha}{n}})(B \otimes I_{\frac{\alpha}{p}}) \quad (1.1)$$

y por la derecha como:

$$A \rtimes B = (I_{\frac{\alpha}{n}} \otimes A)(I_{\frac{\alpha}{p}} \otimes B)$$

donde \otimes es el producto de Kronecker e I_a denota la matriz identidad de dimensiones $a \times a$.

A lo largo de este trabajo se usará el producto semi-tensor por la izquierda como producto matricial por defecto por lo cual se le llamará simplemente producto y en la mayoría de casos se omitirá el símbolo.

La dimensión del producto semi-tensor de dos matrices puede determinarse eliminando el mayor factor común de las dimensiones de las matrices. Por ejemplo

$$A_{p \times qr} \ltimes B_{r \times s} \ltimes C_{qst \times l} = (A \ltimes B)_{p \times qs} \ltimes C_{qst \times l} = (A \ltimes B \ltimes C)_{pt \times l} \quad (1.2)$$

A diferencia del producto tradicional, para el producto semi-tensor incluso cuando $A \ltimes B$ y $B \ltimes C$ están bien definidos el producto $A \ltimes B \ltimes C = (A \ltimes B) \ltimes C$ puede no estar bien definido. Por ejemplo cuando $A \in \mathcal{M}_{3 \times 4}$, $B \in \mathcal{M}_{2 \times 3}$, $C \in \mathcal{M}_{9 \times 1}$.

1.4.1. Matriz de intercambio

Dado que el producto semi-tensor es una generalización del producto matricial convencional, y éste a diferencia del producto escalar no es conmutativo, no se esperaría que tuviera una propiedad conmutativa. Sin embargo se puede dotar al producto semi-tensor de propiedades pseudo-conmutativas (que permiten realizar cosas como separar coeficientes de variables), siendo la herramienta clave para esto la matriz de intercambio (*swap matrix*).

Definición 1.4.2 Una matriz de intercambio $W_{[m,n]}$ es una matriz de dimensiones $mn \times mn$ definida de la siguiente manera. Sus filas y columnas están etiquetadas por un doble índice (i, j) , las columnas están organizadas por multi-índices ordenados $Id(i, j; m, n)$ y las filas están organizadas por multi-índices ordenados $Id(j, i; n, m)$. El elemento en la posición $[(I, J), (i, j)]$ es entonces

$$w_{(I,J),(i,j)} = \delta_{i,j}^{I,J} = \begin{cases} 1, & I = i \text{ y } J = j \\ 0, & \text{de otra manera} \end{cases} \quad (1.3)$$

La matriz anterior puede usarse en datos etiquetados por multi-índices e intercambiar dos de estos, dicha matriz tiene la propiedad de ser ortogonal, además puede expresarse como

$$W_{[n,m]} = [\delta_n^1 \ltimes \delta_m^1 \cdots \delta_n^n \ltimes \delta_m^1 \cdots \delta_n^1 \ltimes \delta_m^m \cdots \delta_n^n \ltimes \delta_m^m] \quad (1.4)$$

o de la forma

$$W_{[n,m]} = \begin{bmatrix} I_m \otimes \delta_n^{1^T} \\ \vdots \\ I_m \otimes \delta_n^{n^T} \end{bmatrix} \quad (1.5)$$

o equivalentemente

$$W_{[n,m]} = \begin{bmatrix} I_n \otimes \delta_m^1 & \cdots & I_n \otimes \delta_m^m \end{bmatrix} \quad (1.6)$$

La matriz de intercambio posee también las siguientes propiedades de factorización, las cuales reflejan la permutación por bloques que se puede realizar con esta herramienta.

$$W_{[p,q,r]} = (I_q \otimes W_{[p,r]})(W_{[p,q]} \otimes I_r) = (I_r \otimes W_{[p,q]})(W_{[p,r]} \otimes I_q) \quad (1.7)$$

$$W_{[p,q,r]} = (W_{[p,r]} \otimes I_q)(I_p \otimes W_{[q,r]}) = (W_{[q,r]} \otimes I_p)(I_q \otimes W_{[p,r]}) \quad (1.8)$$

1.4.2. Forma matricial de expresiones lógicas

Una variable lógica toma valores de $\mathcal{D} = \{T, F\}$ o equivalentemente $\mathcal{D} = \{1, 0\}$. Para obtener una expresión en forma matricial se definen los valores verdadero y falso como vectores.

$$T := \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix}, \quad F := \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix} \quad (1.9)$$

Es necesario también especificar cierta notación :

- δ_k^i es la i -ésima columna de la matriz identidad I_k .
- $\Delta_k := \{\delta_k^i | i = 1, 2, \dots, k\}$.
- Por simplicidad se denotará $\Delta = \Delta_2 = \{\delta_2^1, \delta_2^2\} = \left\{ \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix}, \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix} \right\}$.

Un operador lógico r -ario (que involucra r variables) es un mapeo $\sigma : \Delta^r \rightarrow \Delta$.

Definición 1.4.3 Una matriz $L \in (M)_{n \times m}$ será llamada una matriz lógica si $Col(L) \subset \Delta_n$. El conjunto de matrices lógicas $n \times m$ se denota por $\mathcal{L}_{n \times m}$.

Si $L \in \mathcal{M}_{n \times m}$ entonces tiene la forma

$$L = [\delta_n^{i_1} \ \delta_n^{i_2} \ \cdots \ \delta_n^{i_m}]. \quad (1.10)$$

Para hacer la notación más compacta se escribirá como

$$L = \delta_n[i_1 \ i_2 \ \cdots \ i_m]. \quad (1.11)$$

Definición 1.4.4 Una matriz M_σ de dimensiones 2×2^r se dice que es la matriz de estructura del operador lógico r -ario σ si

$$\sigma(p_1, \dots, p_r) = M_\sigma \times p_1 \times \dots \times p_r := M_\sigma \times_{i=1}^r p_i. \quad (1.12)$$

A continuación se mostrarán algunas matrices de estructura de operadores lógicos importantes.

$$\neg \rightarrow M_n = \delta_2[2 \ 1] \quad (1.13)$$

$$\wedge \rightarrow M_c = \delta_2[1 \ 2 \ 2 \ 2] \quad (1.14)$$

$$\vee \rightarrow M_d = \delta_2[1 \ 1 \ 1 \ 2] \quad (1.15)$$

$$\Rightarrow \rightarrow M_i = \delta_2[1 \ 2 \ 1 \ 1] \quad (1.16)$$

$$\Leftrightarrow \rightarrow M_e = \delta_2[1 \ 2 \ 2 \ 1] \quad (1.17)$$

Además de la anteriores una matriz importante es la llamada matriz de reducción de potencia

$$M_r = \delta_4[1 \ 4]. \quad (1.18)$$

Si $p \in \Delta$ entonces

$$p^2 = M_r p. \quad (1.19)$$

Teorema 1.4.1 (Teorema 3.1 en [6]) Dada una función lógica $f(p_1, \dots, p_r)$ con variables lógicas p_1, p_2, \dots, p_r , existe una única matriz M_f , llamada la matriz de estructura de f , tal que

$$f(p_1, \dots, p_r) = M_f p_1 p_2 \dots p_r. \quad (1.20)$$

Además $M_f \in \mathcal{L}_{2 \times 2^r}$.

La prueba del teorema anterior puede consultarse en el capítulo 3 de [6].

1.5. Dinámica de redes Booleanas

Primero se dará la definición formal de una red Booleana.

Definición 1.5.1 Una red Booleana es un conjunto de nodos x_1, x_2, \dots, x_n , los cuales interactúan de manera simultánea entre ellos. A cada tiempo dado $t = 0, 1, 2, \dots$, un nodo tiene únicamente uno de dos valores: 1 o 0. De manera que la red puede ser descrita por un sistema de ecuaciones:

$$\begin{cases} x_1(t+1) = f_1(x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t)) \\ x_2(t+1) = f_2(x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t)) \\ \vdots \\ x_n(t+1) = f_n(x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t)) \end{cases} \quad (1.21)$$

donde $f_i, i = 1, 2, \dots, n$, son funciones lógicas n -arias.

Cabe destacar que, de acuerdo a la definición, las funciones $f_i, i = 1, 2, \dots, n$ deben involucrar a todas las variables. En la mayoría de los casos los grados de las funciones son menores a n , de manera que no intervienen todas las variables, para esto se usa el operador *dummy* $\sigma_d := \sigma_d(p, q) = q, \forall p, q \in \mathcal{D}$. La matriz estructurante es entonces

$$E_d := \sigma_2[1 \ 2 \ 1 \ 2]. \quad (1.22)$$

Con este operador se pueden «fabricar» variables de manera que aparecen formalmente en la función pero no afectan su valor.

A continuación se presenta la definición del vector con el se caracteriza el estado del sistema Booleano en forma algebraica.

Lema 1.5.1 (*Lema 4.1 en [6]*) Sean $p_i, i = 1, 2, \dots, n$, variables lógicas en forma vectorial, es decir $p_i \in \Delta$. Si se define

$$x = \times_{i=1}^n p_i \quad (1.23)$$

Entonces $p_i, i = 1, 2, \dots, n$, están determinados de forma única por x .

De manera similar a lo anterior es posible expresar una función lógica en forma matricial.

Lema 1.5.2 (*Lema 4.3 en [6]*) Sea $x = \times_{i=1}^n p_i$. Usando la forma vectorial cada ecuación lógica

$$f_i(p_1, p_2, \dots, p_n) = c_i, \quad i = 1, 2, \dots, m,$$

en el sistema [1.21] puede ser expresada como

$$M_i x = c_i, \quad i = 1, 2, \dots, m. \quad (1.24)$$

donde $M_i \in \mathcal{L}2 \times 2^n$.

Cabe destacar que la matriz anterior puede modificarse para completar la inclusión de todas las variables lógicas del sistema.

El sistema Booleano puede ser transformado a su forma algebraica con base en los resultados siguientes.

Teorema 1.5.1 (*Teorema 4.1 en [6]*) Sea $x = \times_{i=1}^n x_i, b = \times_{i=1}^n f_i(x_1, x_2, \dots, x_n), c_i = cte, i = 1, \dots, n$, donde $x_i \in \Delta$ el sistema de ecuaciones lógicas $f_i = c_i$, puede ser transformado a una ecuación lineal algebraica

$$Lx = b \quad (1.25)$$

donde

$$\begin{aligned} L &= M_1 \times_{j=2}^n [(I_{2^n} \otimes M_j) \phi_n] \\ \phi_n &= \prod_{i=1}^n I_{2^{i-1}} \otimes [(I_2 \otimes W_{[2, 2^{j-i}]}) M_r] \end{aligned} \quad (1.26)$$

Usando el teorema anterior se puede expresar el sistema [1.21] en su forma algebraica lineal

$$\mathbf{x}(t + 1) = \mathbf{L}\mathbf{x}(t) \quad (1.27)$$

donde a L se le denomina como matriz de transición. A partir de lo anterior se tiene el siguiente teorema.

Teorema 1.5.2 (Teorema 5.1 en [6]) *La dinámica de la red Booleana [1.21] es determinada de manera única por el sistema dinámico lineal 1.27.*

Demostración De [1.21] es fácil ver que

$$x(t) = L^t x(0), \quad t = 0, 1, 2, \dots \quad (1.28)$$

se sigue entonces que

$$x(t) = M_i L^{i-1} x(0), \quad i = 1, 2, \dots \quad (1.29)$$

por lo tanto [1.27] determina completamente la dinámica de [1.21].

Se tienen las siguientes definiciones

Definición 1.5.2 1. *Un estado $x_0 \in \Delta_2^n$ es un punto fijo del sistema [1.27] si $Lx_0 = x_0$*
 2. *El conjunto $\{x_0, Lx_0, \dots, L^k x_0\}$ se le llama ciclo del sistema [1.27] con longitud k si $L^k x_0 = x_0$ y los elementos en el conjunto $\{x_0, Lx_0, \dots, L^{k-1} x_0\}$ son distintos por pares.*

y los siguientes teoremas.

Teorema 1.5.3 (Teorema 5.2 en [6]) *Considere la red Booleana [1.21]. $\delta_{2^n}^i$ es un punto fijo de ésta si y solamente si, en su forma algebraica [1.27], el elemento diagonal \downarrow_{ii} de la matriz de transición L es igual a 1. Se sigue que el número de puntos fijos en la red es*

$$N_e = \text{tr}(L). \quad (1.30)$$

Teorema 1.5.4 (Teorema 5.3 en [6])

El número de ciclos de longitud s , denotado N_s , es determinado de manera inductiva por

$$\begin{cases} N_1 = N_e, \\ N_s = \frac{\text{tr}(L^s) - \sum_{k \in \mathcal{P}(s)} k N_k}{s}, \quad 2 \leq s \leq 2^n. \end{cases} \quad (1.31)$$

donde $(P)(k)$ denota los factores propios de k .

1.6. Resumen

En este capítulo se presentaron las nociones básicas de biología, producto semi-tensor y redes dinámicas Booleanas. Además de una descripción de la red de regulación genética que regula transición Epitelio-Mesénquima, incluyendo un breve análisis con distintas herramientas computacionales: R, GinSIM y MATLAB, realizando en éste último un análisis a través del producto semi-tensor, encontrando convergencia en los atractores usando los distintos métodos.

Análisis de propiedades estructurales de alcanzabilidad

2.1. Introducción

En el presente capítulo se define una red de control Booleana, se presentan además las nociones básicas de alcanzabilidad y controlabilidad en términos de los sistemas de control Booleanos. Con base en ésto y lo presentado en el capítulo anterior se realiza el análisis de las propiedades estructurales de alcanzabilidad de la red de regulación genética de la TEM, exponiendo los resultados obtenidos, y se introduce, además, un análisis computacional para diversas mutaciones en la red.

2.2. Redes de control Booleanas

Una red de control Booleana se define como

$$\begin{cases} x_1(t+1) = f_1(x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t), u_1(t), \dots, u_m(t)) \\ x_2(t+1) = f_2(x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t), u_1(t), \dots, u_m(t)) \\ \vdots \\ x_n(t+1) = f_n(x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t), u_1(t), \dots, u_m(t)) \end{cases} \quad (2.1)$$

y

$$y_j(t) = h_j(x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t)), \quad j = 1, \dots, p, \quad (2.2)$$

donde $f_i : \mathcal{D}^{n+m} \rightarrow \mathcal{D}$, $i = 1, \dots, n$ y $h_j : \mathcal{D}^n \rightarrow \mathcal{D}$, $j = 1, \dots, p$, son funciones lógicas, $x_i \in \mathcal{D}$, $i = 1, \dots, n$ son estados, $y_j \in \mathcal{D}$, $j = 1, \dots, p$ son salidas y $u_l \in \mathcal{D}$, $l = 1, \dots, m$ son entradas.

En este trabajo no se estudiará la salida del sistema por no considerarse de interés. Además se usará el control por secuencias Booleanas libres, ya que es la forma más fuerte de control y por lo tanto

permite tener un mejor entendimiento sobre el sistema. Cabe mencionar que éste tipo de control es en lazo abierto.

A continuación se presenta la definición de controlabilidad

Definición 2.2.1 *Considere la red de control Booleana [2.1] y suponga que se tienen los estados $x_0, x_d \in \Delta_{2^n}$. El sistema se dice que es controlable de x_0 a x_d (por secuencia Booleana libre) en el paso s si podemos encontrar un control $u(t) \in \mathcal{D}^m$, $t = 0, 1, \dots, s - 1$ tal que el estado inicial $\times_{i=1}^n x_i(0) = x_0$ puede ser llevado a estado deseado $\times_{i=1}^n x_i(s) = x_d$.*

La forma algebraica del sistema [2.1] es

$$x(t + 1) = Lu(t)x(t), \quad x \in \Delta_{2^n}, \quad u \in \Delta_{2^m} \quad (2.3)$$

Si se define $\tilde{L} = LW_{[2^n, 2^m]}$, entonces se puede expresar como

$$x(t + 1) = \tilde{L}x(t)u(t) \quad (2.4)$$

De manera que

$$\begin{aligned} x(1) &= \tilde{L}x(0)u(0) \\ x(2) &= \tilde{L}x(1)u(1) = \tilde{L}^2x(0)u(0)u(1) \end{aligned}$$

Al hacer lo anterior de manera repetitiva se tiene

$$x(s) = \tilde{L}^s x(0)u(0)u(1) \dots u(s - 1) \quad (2.5)$$

2.2.1. Conjunto de alcanzabilidad

A partir de la expresión [2.5] se puede deducir lo siguiente.

Teorema 2.2.1 *(Teorema 9.3 en [6]) x_d es alcanzable desde x_0 en el paso s por controles de una secuencia Booleana de longitud s si y sólo si*

$$x_d \in \text{Col}\{\tilde{L}^s x_0\} \quad (2.6)$$

NOTA: es importante destacar que [2.6] significa que x_d es igual a una columna de $\tilde{L}^s x_0$. Si, por ejemplo, x_d es igual a la k -ésima columna de $\tilde{L}^s x_0$, entonces los controles deben ser

$$u(0)u(1) \dots u(s - 1) = \delta_{2^m s}^k, \quad (2.7)$$

que determinan de manera única todos los controles u_i , $i = 0, 1, \dots, s - 1$.

De manera que basta con caracterizar el conjunto de alcanzabilidad para realizar un análisis de controlabilidad.

Existe una forma alternativa (y más compacta) para demostrar el resultado anterior, que es mediante la matriz de controlabilidad.

2.2.2. Matriz de controlabilidad

Álgebra Booleana.

Para el cálculo de la matriz de controlabilidad es necesario definir algunas operaciones de álgebra Booleana.

Definición 2.2.2 Si $a, b \in \mathcal{D}$, se puede definir la adición Booleana como

$$a +_{\mathcal{B}} b = a \vee b, \quad (2.8)$$

y el producto Booleano como

$$a \times_{\mathcal{B}} b = a \wedge b. \quad (2.9)$$

Definición 2.2.3 Sea $A = (a_{ij}), B = (b_{ij}) \in \mathcal{B}_{m \times n}$. Se define

$$A +_{\mathcal{B}} B := (a_{ij} +_{\mathcal{B}} b_{ij}). \quad (2.10)$$

Definición 2.2.4 Sea $A \in \mathcal{B}_{m \times n}, B \in \mathcal{B}_{n \times p}$. Se define $A \times_{\mathcal{B}} B = C \in \mathcal{B}_{m \times p}$, donde

$$c_{ij} = \sum_{k=1}^n (a_{ik} \times_{\mathcal{B}} b_{kj}). \quad (2.11)$$

En particular, si $A \in \mathcal{B}_{n \times n}$, entonces

$$A^{(2)} := A \times_{\mathcal{B}} A$$

Matriz de controlabilidad.

Es necesario primero dividir la matriz L en bloques de manera que nos de una matriz cuadrada M , lo cual se realiza de manera simple mediante la siguiente operación

$$M = L \times \mathbf{1}_{2^m}, \quad (2.12)$$

donde $\mathbf{1}_k = \underbrace{[1 \ 1 \ \dots \ 1]}_k^T$.

De [6], se tiene usando, álgebra Booleana, el siguiente

Corolario 2.2.1 (Corolario 16.3 en [6]) Se llama a

$$\mathcal{M}_C := \sum_{s=1}^{2^m+n} M^{(s)} \in \mathcal{B}_{2^n \times 2^n} \quad (2.13)$$

la matriz de controlabilidad y se escribe $\mathcal{M}_C = (c_{ij})$. Entonces

1. $\delta_{2^n}^i$ es alcanzable desde $\delta_{2^n}^j$ si y sólo si $c_{ij} > 0$.
2. El sistema es controlable en $\delta_{2^n}^j$ si y sólo si $Col_j(\mathcal{M}_C) > 0$.
3. El sistema es controlable si y sólo si $\mathcal{M}_C > 0$.

Cabe destacar que la notación $A > 0$ donde A es una matriz, significa que cada uno de sus entradas $a_{ij} > 0$.

2.3. Análisis de la red y resultados

El análisis de las propiedades estructurales de alcanzabilidad se realizó usando sólo una entrada de control, ya que la manipulación biológica de múltiples genes es, en estos momentos, poco realista.

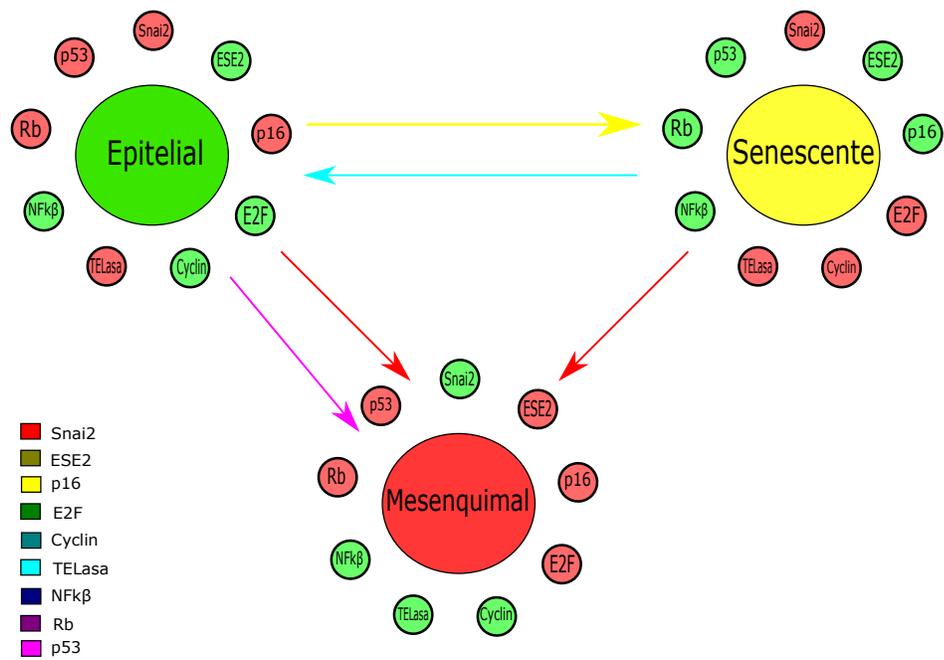
Para realizar el análisis utilizando el algoritmo presentado en [2], el cuál consiste en obtener los atractores, los cuales en el caso de la red TEM son de tres y de punto fijo, y agregando una señal de control en uno de los nodos calcular el conjunto de alcanzabilidad para obtener las posibles trayectorias entre los atractores, este algoritmo se repite para cada uno de los nodos y atractores de la red.

2.3.1. Trayectorias posibles

Se realizaron tres análisis bajo distintas suposiciones para agregar la señal de control en cada uno de los nodos:

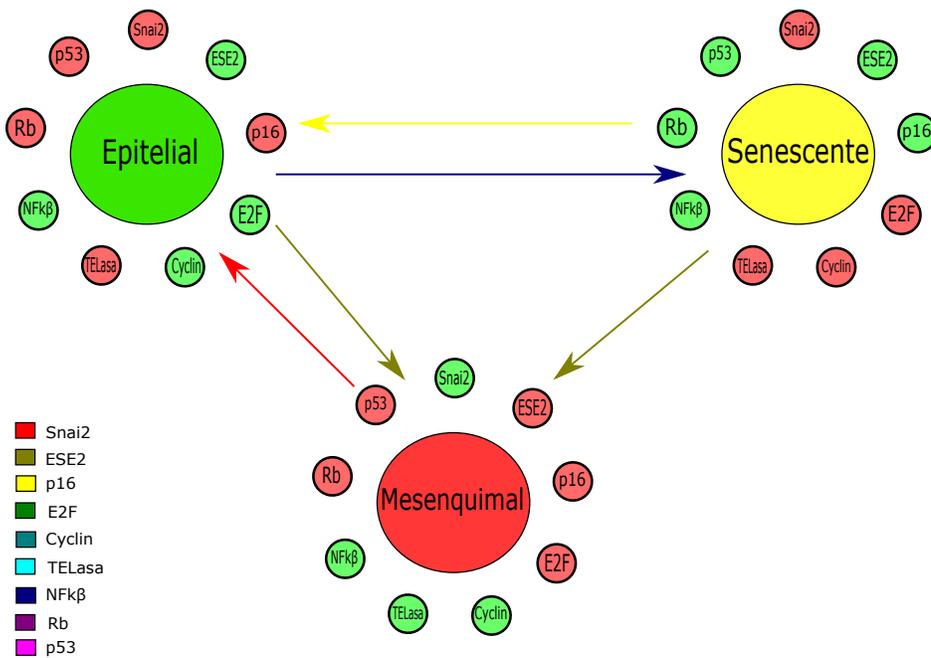
1. Usando una regla OR: se puede encender el módulo a voluntad pero el apagado depende de la dinámica del mismo, esto se podría interpretar como un promotor de dicho módulo.
2. Usando una regla AND: se puede apagar el módulo a voluntad pero el encendido depende de la dinámica del mismo, esto se podría interpretar como un inhibidor del módulo.
3. Ignorando la dinámica del nodo: el módulo se puede encender o apagar a voluntad, representando así la forma más fuerte de control.

Los resultados se resumen en sus correspondientes diagramas, en los cuales están representados los atractores y las posibles trayectorias que existen entre ellos.



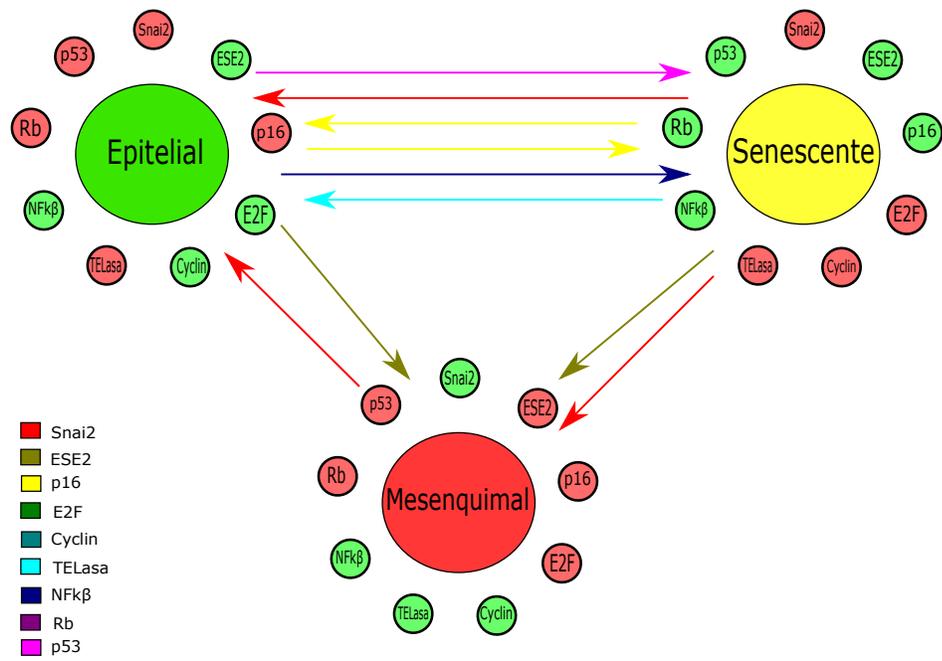
Transiciones con función OR

Figura 2.1: **Diagrama usando regla OR:** Se puede observar que una vez en el estado mesenquimal ya no es posible salir de él. Existe un control a través de TELasa que puede llevar del estado senescente al epitelial.



Transiciones con función AND

Figura 2.2: **Diagrama usando regla AND:** Es posible mover el sistema del estado mesenquimal al epitelial a través del nodo Snai2. Además existe una trayectoria del estado senescente al epitelial a través de p16.



Transiciones ignorando la dinámica

Figura 2.3: **Diagrama ignorando la dinámica:** La mayoría de las trayectorias resultan de la unión de los resultados anteriores. Las nuevas trayectorias se intuye requieren de un control más fuerte, es decir, controlar totalmente el encendido y apagado del módulo de manera precisa para poder modificar el estado del sistema.

2.3.2. Trayectoria mesenquimal-epitelial

Como se observa de los diagramas de las trayectorias posibles sólo se puede transitar del estado mesenquimal al estado epitelial a través del módulo Snai2 con prioridad a su apagado (represión). Se consideró que para afectar de manera mínima el sistema una entrada de control en 1 está relajada ya que permite que la dinámica del módulo siga su curso. Se encontraron dos secuencias, ambas de longitud $s = 3$, para la transición $u_1 = \delta_8^7$ y $u_1 = \delta_8^8$, las cuales arrojaron los siguientes resultados.

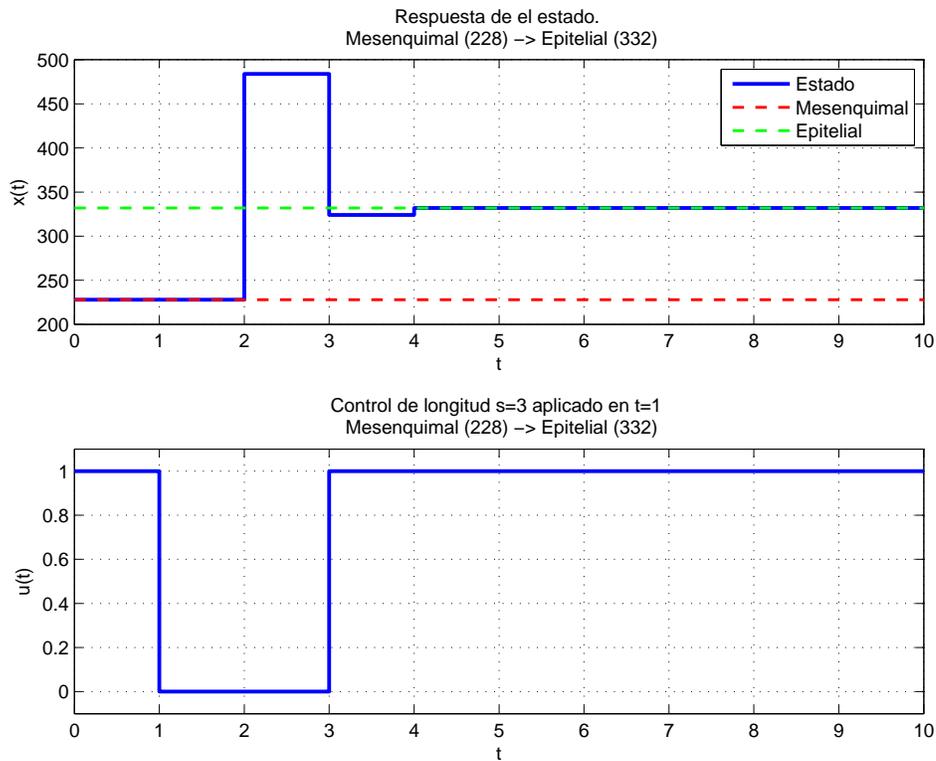


Figura 2.4: **Control** u_1 : se muestra la transición en el estado del sistema (en forma escalar, de acuerdo a las conversiones del método) y la secuencia de control (en forma binaria).

Se puede observar que el control se aplica en el tiempo $t = 1$ y que $s = 3$ pasos después se llega al estado deseado.

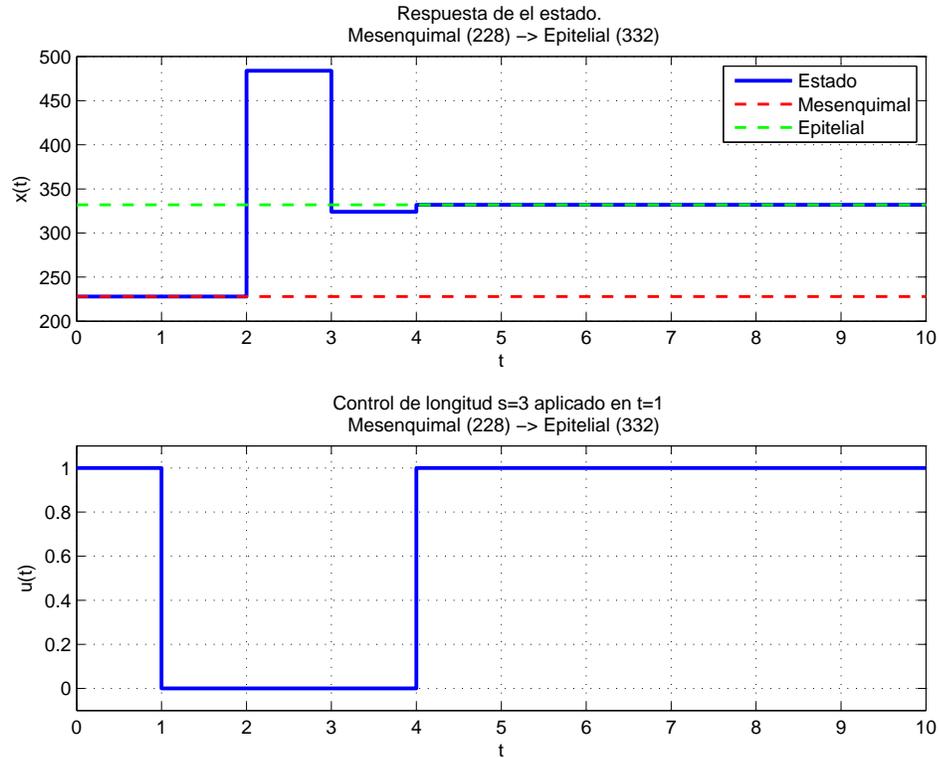


Figura 2.5: **Control u_2** : se muestra la transición en el estado del sistema (en forma escalar) y la secuencia de control (en forma binaria).

2.4. Simulación computacional de mutantes

Se realizaron experimentos mutando la red de la siguiente manera. Se mutó un sólo nodo a la vez, esto es, se forzó a tener sólo un valor (encendido o apagado). Posteriormente se buscaron los atractores de la red y se realizó un análisis de controlabilidad y alcanzabilidad con controles en los nodos no mutados. Lo anterior se repitió para cada uno de los nodos de la red.

Los resultados del procedimiento anterior se reportan en forma de diagramas en el apéndice A, en ésta sección se realiza una síntesis de dichos resultados.

2.4.1. Módulo *Snai2*

En el caso del apagado se pierde el atractor correspondiente al estado mesenquimal. Cuando es forzado a ser encendido el único atractor que existe corresponde al estado mesenquimal. Lo anterior demuestra la importancia que tiene dicho módulo en la red.

2.4.2. Módulo *ESE2*

Cuando es apagado el único atractor que existe corresponde al estado mesenquimal, al ser encendido aparece un nuevo atractor 124 y desaparece el atractor del estado mesenquimal. De manera que la

mutación del módulo tiene un gran impacto en la red.

2.4.3. Módulo $p16$

Al forzar el apagado del módulo se pierde el atractor asociado al estado senescente, de manera que únicamente quedan los atractores correspondientes a los estados epitelial y mesenquimal.

Al forzar el encendido desaparecen los atractores epitelial y mesenquimal, quedando sólo el senescente. Además aparece un nuevo atractor 178.

2.4.4. Módulo $E2F$

Cuando se apaga el módulo $E2F$ el atractor epitelial desaparece y es sustituido por el atractor del estado 364.

Si el módulo se enciende desaparecen los atractores mesenquimal y senescente, y emergen tres nuevos atractores 196, 146, 281, siendo en total cuatro atractores, este es el mayor número de atractores correspondientes a una mutación en la red.

2.4.5. Módulo $Cyclin$

Al apagarse el módulo el atractor epitelial es sustituido por 348 y el mesenquimal por 244. Al forzar el encendido el atractor senescente es sustituido por 297. En este caso no hay una modificación importante en el comportamiento de la red.

2.4.6. Módulo $TELasa$

Al apagar $TELasa$ el atractor mesenquimal es sustituido por 236, cuya única diferencia es el estado del módulo mutado. De igual manera al encenderlo el atractor epitelial es sustituido por 324. El atractor correspondiente al estado senescente desaparece y el atractor 306 toma su lugar, estos últimos tienen una mayor diferencia, sin embargo las transiciones posibles en la red se presentan de forma similar a la original.

2.4.7. Módulo $NFk\beta$

El apagado de este módulo provoca que desaparezcan todos los atractores de la red original y surgiendo dos atractores, 248 y 317. Los cuales parecen tomar el papel de los atractores epitelial y mesenquimal respectivamente.

Al encenderlo se recuperan los atractores originales y sus trayectorias, excepto la que involucra el presente módulo.

2.4.8. Módulo Rb

Al apagar Rb , el comportamiento de la red es aparentemente similar, se mantienen las trayectorias pero con distintos atractores, ya que el atractor senescente es sustituido por 315. Al encender el módulo

sucede algo similar, sólo que los atractores sustituidos son el epitelial (por 362) y el mesenquimal (por 226).

2.4.9. Módulo $p53$

Al apagarlo, el atractor senescente es sustituido por 314 y casi se mantienen todas las trayectorias, excepto la que involucra a $NFk\beta$ y se agrega una nueva trayectoria.

Al forzar el encendido sólo se mantiene el atractor senescente y aparece uno nuevo correspondiente a 177.

2.5. Resumen

En este capítulo se presentaron las bases teóricas sobre las redes de control Booleanas y su análisis de controlabilidad y alcanzabilidad. A partir éstas se presentaron los resultados del análisis de las propiedades estructurales de alcanzabilidad de la red bajo distintas suposiciones con respecto al tipo de acción de control que puede ejercerse sobre cada uno de los nodos. Se introdujo además un análisis con respecto a la mutación en cada uno de los nodos, realizando un análisis de las propiedades estructurales de alcanzabilidad para cada uno de ellos, obteniendo los posibles atractores y las posibles trayectorias entre éstos.

Interpretación de los resultados

3.1. Introducción

Es importante dar una interpretación para los resultados obtenidos en la exploración de una red propuesta a partir de evidencia experimental. Por lo tanto, en este capítulo se presenta una interpretación de los resultados a la luz de la biología, y se agregan, además, algunas evidencias soportadas por datos de recientes estudios experimentales que confirman la pertinencia de los hallazgos teóricos en el ámbito experimental.

A partir de los diferentes análisis realizados se observan las transiciones posibles para el modelo bajo los distintos supuestos de las señales de control. Se puede observar que existen diversos caminos para poder llevar el sistema de un estado epitelial a un estado senescente, esto a través de controlar los módulos *Nfkβ*, *p53*, *p16*, *TELa* y *Snai2*. Existen también trayectorias para llegar al estado mesenquimal, partiendo del estado senescente puede ser a través de controlar los nodos *Snai2* y *ESE2*, y del estado epitelial directamente al mesenquimal mediante *ESE2*.

El módulo *ESE2* parece ser importante para la TEM, ya que su inactividad lleva al estado mesenquimal. Además en el análisis de mutantes, al apagar el módulo se obtiene únicamente el atractor mesenquimal, sin embargo al encenderlo de manera permanente, el atractor mesenquimal es sustituido por un atractor cuya distancia de Hamming es de 3 con respecto al atractor mesenquimal como para el atractor epitelial, de tal forma que pareciera que la célula se encontraría en algún punto intermedio de comportamiento con respecto a ambos fenotipos.

Más interesante aún es el caso de la transición Mesénquima-Epitelio, la cual es únicamente posible a través del control de *Snai2*, de forma más específica, con una acción represora de dicho módulo. De manera que *Snai2* es un módulo crítico para el fenotipo mesenquimal, la TEM y la TME. Lo anterior puede ser comprobado también con base en los experimentos realizados con los mutantes, ya que al mutar el módulo *Snai2* podemos observar la desaparición del atractor correspondiente al estado cuando dicho módulo es silenciado (apagado), en contraparte cuando el módulo es encendido de forma permanente el sistema tiene un único atractor, el mesenquimal.

3.2. Importancia del módulo *ESE2*

De acuerdo a los resultados anteriores se puede intuir que el módulo *ESE2* tiene especial importancia en la TEM, en particular una disminución en su expresión parece llevar el sistema al estado mesenquimal. Es importante recordar que éste representa la actividad de distintos genes, y de acuerdo con GeneCards [16] se tiene la siguiente información:

- **ESE-1:** También conocido como *ELF3*, es un gen que codifica proteínas. Está asociado con padecimientos como Sarcoma, sinoviales y de deficiencias en la hormona del crecimiento.
- **ESE-2:** También conocido como *ELF5*, se cree que regula algunos genes específicos epiteliales encontrados en tejidos que contienen epitelios glandulares, además de su rol regulador en las etapas tardías de la diferenciación de queratinocitos (células predominantes en la epidermis, capa más superficial de la piel).
- **ESE-3:** También conocido como *EHF*. La proteína codificada actúa como un represor transcripcional y podría estar involucrado en la diferenciación epitelial y carcinogénesis.

Recientemente se han realizado estudios sobre el vínculo de *ESE2* y la TEM, encontrándose relación con el cáncer de mama, además de una relación de represión con *Snai2* [3], esto parece validar los resultados teóricos obtenidos, tanto del análisis de controlabilidad y alcanzabilidad como el análisis de mutantes, en éste último en particular, cuando *ESE2* es activado de manera permanente, pareciera tener un antagonismo con respecto a ciertas características de *Snai2* y viceversa, de manera que la célula no toma completamente el fenotipo mesenquimal o epitelial.

Se ha establecido una relación en la regulación de *ESE2* y la TEM en cáncer urotelial [20]. Existe además evidencia de que una baja expresión de *ESE2* aumenta la viabilidad de células cancerígenas en cáncer de próstata [11] y cáncer de endometrio [21].

También existe evidencia para otros de los componentes del módulo, tal es el caso de *ESE3*, en el que se ha encontrado que su inhibición induce la TEM y características pluripotenciales y tumorigénicas en células epiteliales prostáticas [1]. En el caso de *ESE1* se encontró que una disminución en su expresión está asociada con un bajo índice de supervivencia en casos de células de cáncer ovárico, y en contraposición su sobre expresión evita la proliferación de las células malignas, favorece la expresión de marcadores epiteliales y disminuye la expresión de marcadores mesenquimales [23].

3.3. Importancia del módulo *Snai2*

A partir de los experimentos computacionales realizados resulta evidente que el módulo *Snai2* tiene una especial importancia en la red de la TEM. Es importante recalcar que de acuerdo a la red propuesta en [12] el módulo *Snai2* representa diversos FT y genes, los cuales se enuncian a continuación con su correspondiente descripción obtenida de GeneCards [16] :

- **Snai2 (Slug):** actúa como un represor transcripcional de E-cadherina en carcinoma de mama. La proteína está relacionada con las transiciones epitelio-mesénquima y tiene una actividad anti-apoptósica.
- **Snail:** Se considera crítica para la formación del mesodermo durante el desarrollo embrionario.
- **Twist1:** Juega un papel importante en el desarrollo embrionario, regulando la cerradura del tubo neural y el desarrollo de extremidades. El gen está sobre expresado en distintos tipos de cáncer en humanos, y la proteína codificada promueve la invasión de células tumorales y metástasis.
- **Twist2:** El gen puede estar sobre regulado en algunos tipos de cáncer.
- **ZEB1:** Codifica un factor de transcripción de tipo dedo de zinc. Las mutaciones en este gen están asociadas con distrofia corneal.
- **ZEB2:** Se localiza en el núcleo y funciona como un represor transcripcional que interactúa con SMAD (conjunto de proteínas críticas en la regulación del desarrollo celular y el crecimiento) activadas.
- **FOXC2:** La función de este gen no ha sido determinada sin embargo se especula que tiene un rol en el desarrollo de tejidos mesenquimales.

Los resultados muestran que la transición Mesénquima-Epitelio es posible en términos teóricos. Aunque se sospechaba la existencia de una transformación ME, el hecho de confirmarla demostraría la plasticidad celular en el estado Mesenquimal [22].

Recientemente se ha encontrado evidencia experimental sobre la posible inducción de una TME que atenúa la malignidad del cáncer [17], dicho experimento se realizó a través de la manipulación indirecta de los FT del módulo *Snai2* (excepto *FOXC2*).

Se ha encontrado también evidencia de la relación de la TEM con *ZEB1* y *ZEB2*, y la regulación de la resistencia a tratamientos en cáncer de próstata [8].

Además se determinó que *FOXC2* promueve la proliferación celular del cáncer, induce la TEM y contribuye a la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos) tumoral [18].

Conclusiones y perspectivas

Con el objetivo de analizar las propiedades de la red de regulación genética subyacente a la transición Epitelio-Mesénquima a la luz de la teoría de sistemas dinámicos, fue realizado un estudio apoyándose de las herramientas matemáticas y computacionales y otros resultados disponibles, obteniéndose conclusiones interesantes especialmente desde el punto de vista biológico.

El análisis realizado bajo tres supuestos distintos sobre el control en lazo abierto del sistema resultó en la obtención de los atractores (puntos de equilibrio) y las trayectorias posibles entre éstos mediante el uso de un controlador de secuencia libre en un sólo nodo a la vez. Estos resultados se encuentran sintetizados en las figuras 2.3,2.1,2.2.

Dentro de los resultados obtenidos, la transición del estado mesenquimal al epitelial es de particular interés ya que podría representar una nueva forma para el tratamiento de enfermedades como el cáncer. Por éste motivo se obtuvo la secuencia de control necesaria y se realizó la simulación del sistema usando los controles obtenidos, de forma que se comprobó su funcionamiento en el modelo Booleano.

El estudio de los mutantes permite averiguar el efecto de los módulos en los atractores del sistema, permitiendo con esto dilucidar los efectos de sus componentes en la red. Tal es el caso en particular de los nodos *ESE2* y *Snai2*, los cuales a partir de análisis computacional de la red se intuyó su importancia dentro de la transición epitelio-mesénquima y por lo tanto en el desarrollo de enfermedades cancerosas de origen epitelial.

Cabe destacar que ninguno de los resultados sería significativo si la red en la cual se basa el presente análisis no se encontrara en el nivel de calidad presentado en [12], por lo cual es imperativo reconocer el trabajo realizado para la obtención del núcleo regulatorio de la GRN de la TEM. Es importante destacar que en los últimos años se han desarrollado experimentos, de manera independiente, que sustentan las observaciones obtenidas en el análisis de la GRN mediante la metodología del producto semi-tensor. Estos experimentos ofrecen no solo una validación de los resultados y un sustento importante para las interpretaciones de éstos, sino que corroboran la precisión y los alcances de la red en sí misma. Más aún, la evidencia experimental demuestra el gran impacto que este tipo de metodología puede tener en el campo biológico y médico, llegando incluso a niveles de aplicación clínica. En términos de los resultados obtenidos y su validación en términos experimentales, se puede tener una guía para enfocar la investigación experimental sobre la Transición Epitelio-Mesénquima, y los temas relacionados,

a ciertos genes y factores de transcripción, los cuales podrían ser los involucrados en los módulos *ESE2* y *Snai2*. Cabe destacar que la presente metodología podría ser aplicada a otras redes de regulación genética para obtener información similar a la que se obtuvo con este análisis, lo cual podría ayudar a focalizar los esfuerzos de investigación para generar resultados en un plazo más corto. Es también importante mencionar que la aplicación práctica de las señales de control obtenidas es muy compleja, dada la naturaleza de los organismos, sin embargo la tecnología permite realizar la mutación de distintos genes, quizá diferentes al que se desea controlar, de forma que podría establecerse un control indirecto sobre los nodos de interés. Además, dado que muchos de los FT descritos como críticos en la TEM también lo son durante el desarrollo embrionario es posible que esto limite la viabilidad de su modificación.

Dentro del trabajo futuro que podría realizarse, está el de crear una herramienta que facilite el uso por personas ajenas a la comunidad de sistemas dinámicos y control, de manera que pueda ser usado de forma sencilla por la comunidad de estudio de la biología. Esto requeriría automatizar la conversión de reglas lógicas al formato necesario para el uso por las herramientas del producto semi-tensor, y facilitar o automatizar el análisis y la generación de imágenes que sinteticen los resultados, lo cual podría ser logrado a través de un *Front-End* con una interfaz gráfica para la interacción con el usuario.

Sería interesante generar la información necesaria en para realizar las simulaciones usando la red original de 47 nodos para validar los análisis realizados en el núcleo de la red (de 9 nodos). Cabe destacar que debido a la complejidad computacional del producto semi-tensor este enfoque de análisis es viable sólo para redes pequeñas, e incluso para una red como la analizada fue necesario simplificar las funciones lógicas para lograr realizar los cálculos, sin embargo la simulación podría ser llevada a cabo en un sistema Booleano «grande». Un enfoque distinto podría ser el uso de *hardware* acelerador interno o externo para realizar el cómputo del producto semi-tensor, lo cual podría ser desarrollado mediante el uso de dispositivos programables tales como los FPGA. Por otro lado la implementación del instrumental del producto semi-tensor en un lenguaje computacional de alto rendimiento podría ser una alternativa viable, además dicha implementación podría ser accesible sin la necesidad de herramientas especializadas como MATLAB.

Diagramas de mutantes

En éste apéndice se presentan los resultados del análisis de mutantes, los cuales incluyen los atractores encontrados y las posibles trayectorias entre estos con base en un control. Debido a que la mutación de los módulos impone restricciones en el conjunto de estados que puede tomar la red pueden aparecer o desaparecer algunos atractores. Los atractores nuevos están representados en color azul y con un número que indica su forma escalar decimal de acuerdo a las reglas de conversión para el análisis de los sistemas Booleanos, usando el producto semi-tensor, y con su representación Booleana en cada uno de los componentes, siendo rojo = apagado y verde = encendido.

A.1. Mutantes con control ignorando la dinámica

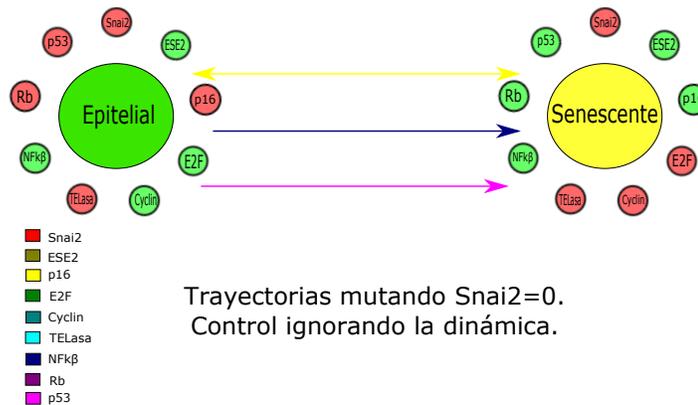
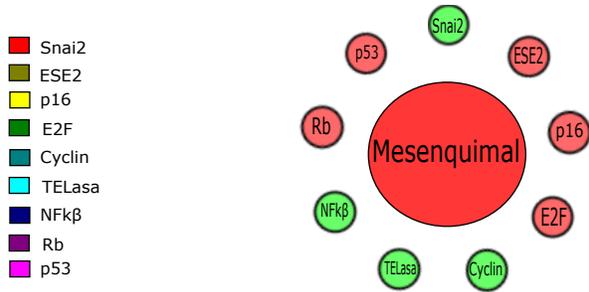
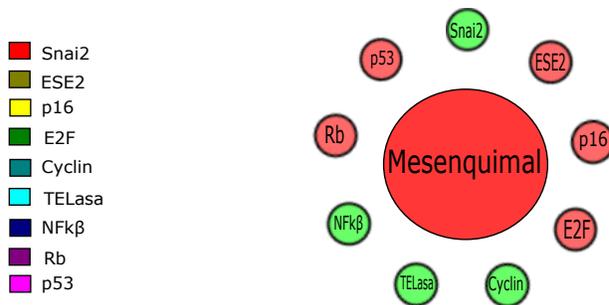


Figura A.1: Trayectorías posibles apagando *Snai2*.



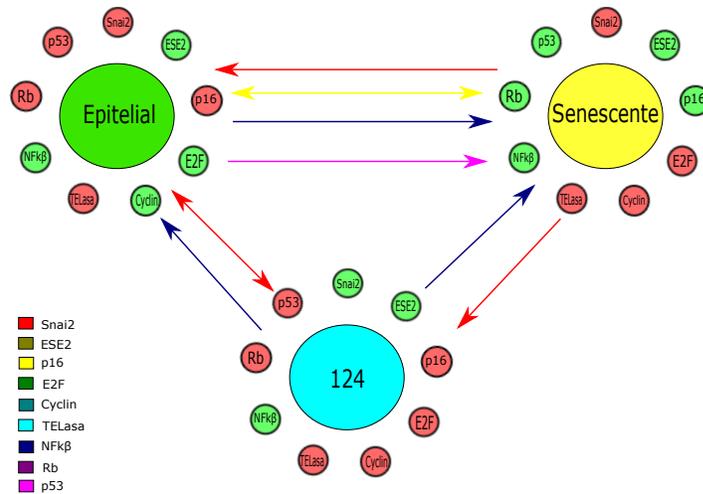
Atractor mutando $Snai2=1$.
Control ignorando la dinámica.

Figura A.2: Trayectorías posibles encendiendo $Snai2$.



Atractor mutando $ESE2=0$,
ignorando la dinámica.

Figura A.3: Trayectorías posibles apagando $ESE2$.



Trayectorias mutando $ESE2=1$.
Control ignorando la dinámica.

Figura A.4: Trayectorías posibles encendiendo $ESE2$.

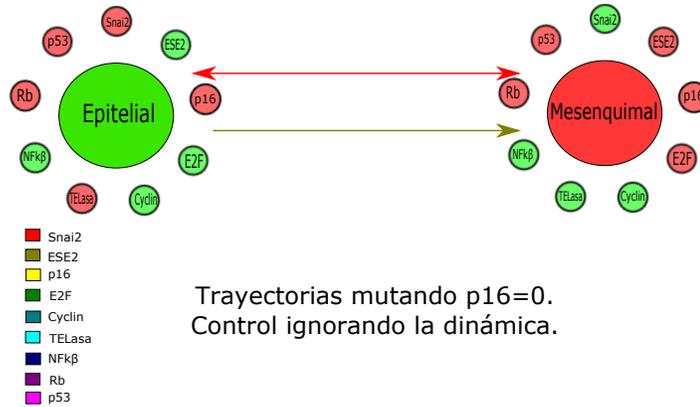


Figura A.5: Trayectorías posibles apagando $p16$.

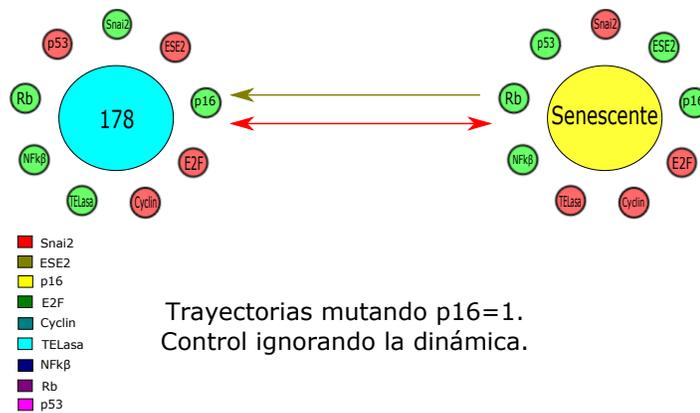


Figura A.6: Trayectorías posibles encendiendo $p16$.

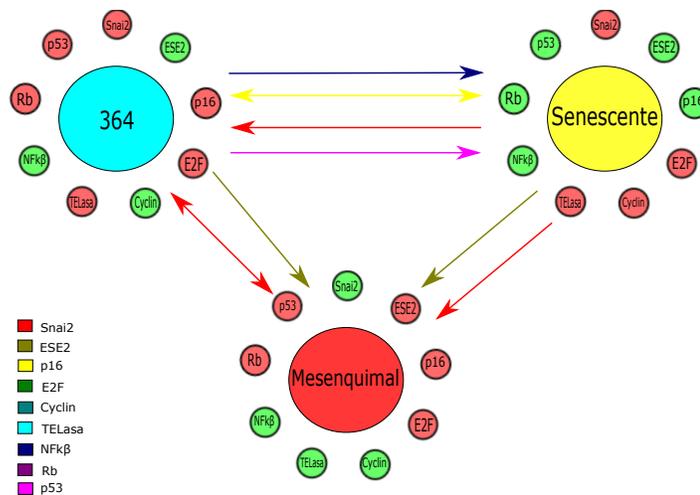


Figura A.7: Trayectorías posibles apagando $E2F$.

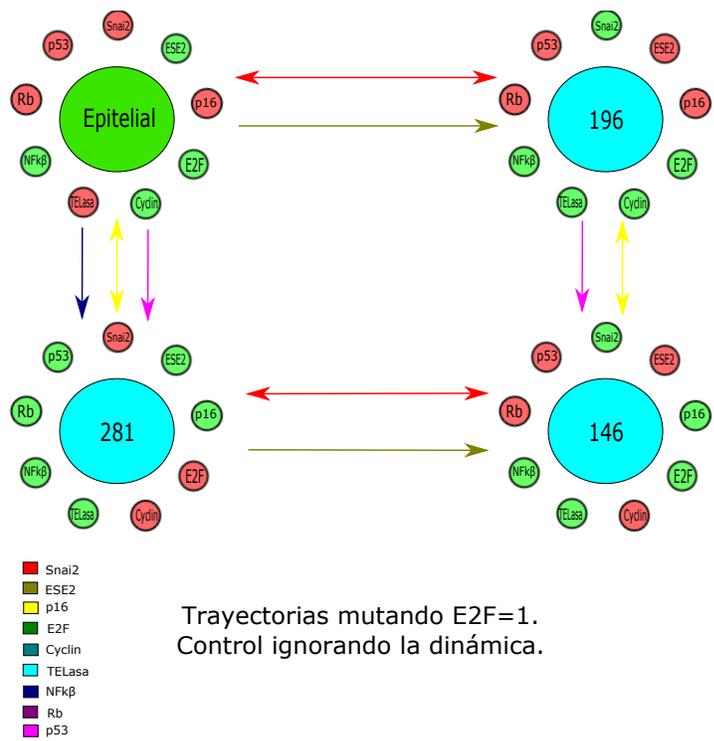


Figura A.8: Trayectorías posibles encendiendo $E2F$.

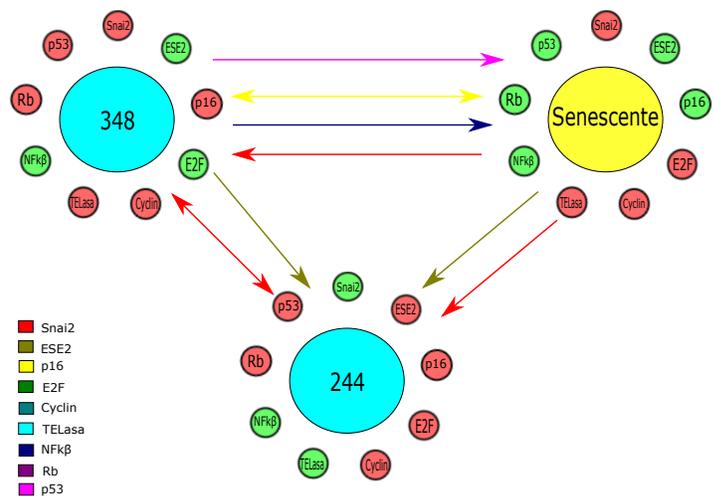
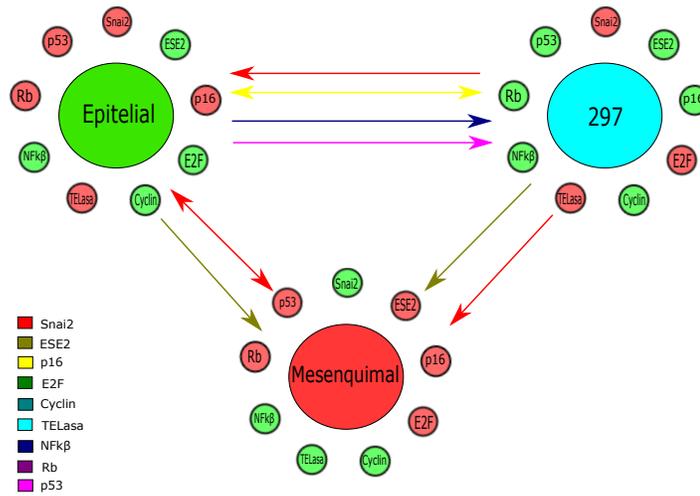
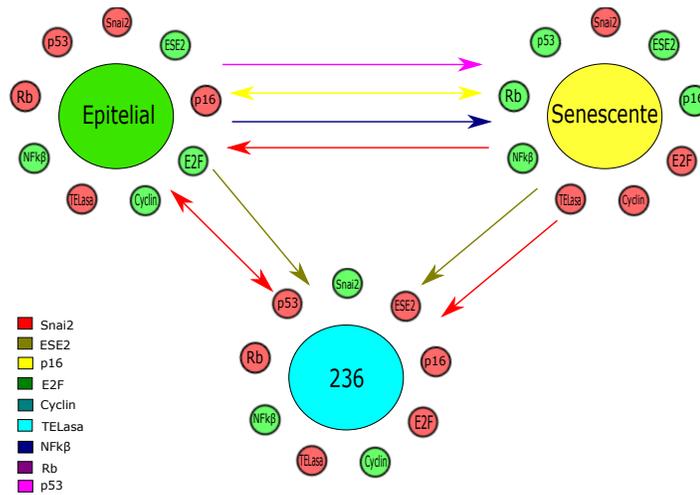


Figura A.9: Trayectorías posibles apagando $Cyclin$.



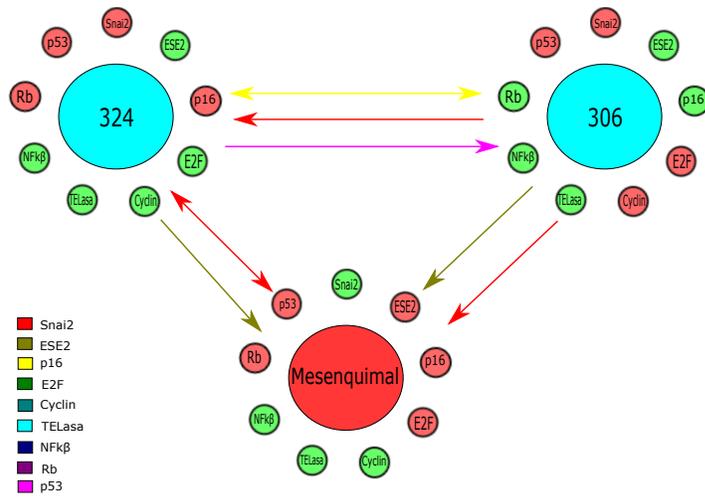
Trayectorias mutando *Cyclin*=1.
Control ignorando la dinámica.

Figura A.10: Trayectorías posibles encendiendo *Cyclin*.



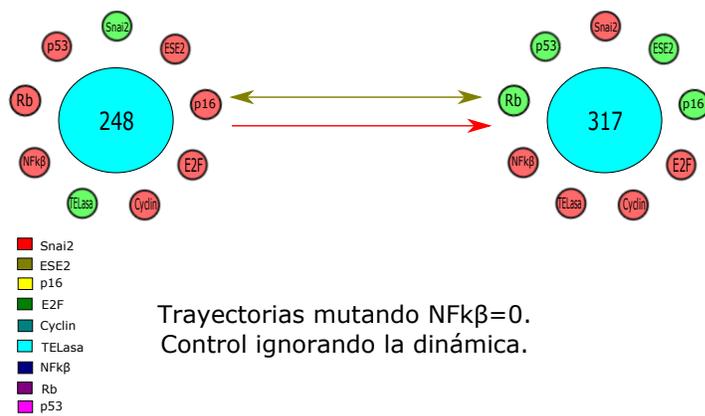
Trayectorias mutando *TELasa*=0.
Control ignorando la dinámica.

Figura A.11: Trayectorías posibles apagando *TELasa*.



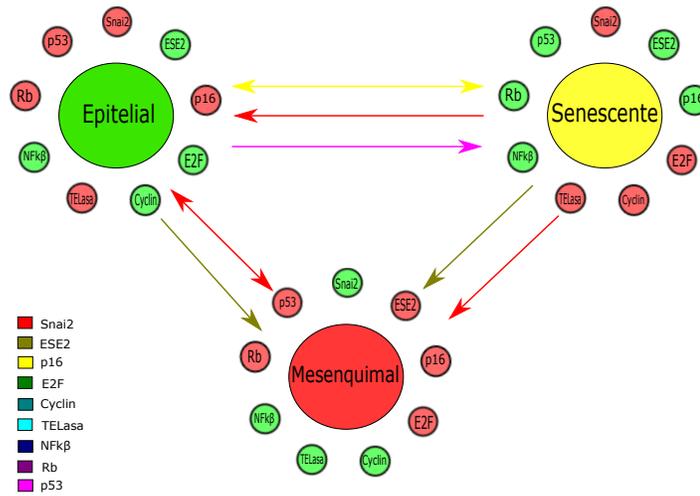
Trayectorias mutando $TELasa=1$.
 Control ignorando la dinámica.

Figura A.12: Trayectorías posibles encendiendo *TELasa*.



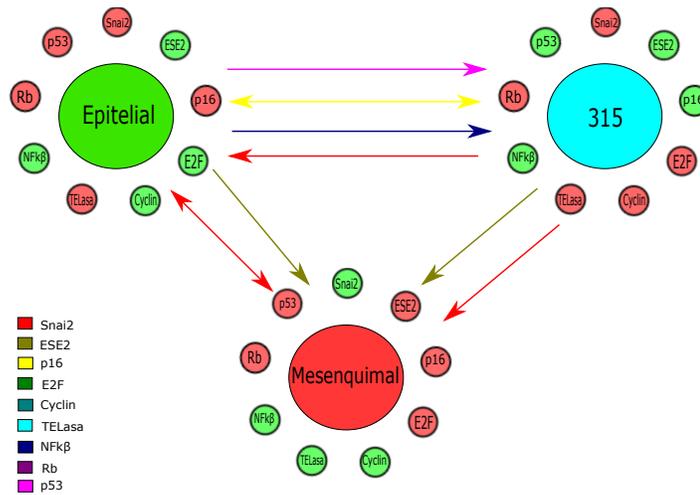
Trayectorias mutando $NFK\beta=0$.
 Control ignorando la dinámica.

Figura A.13: Trayectorías posibles apagando *NFKβ*.



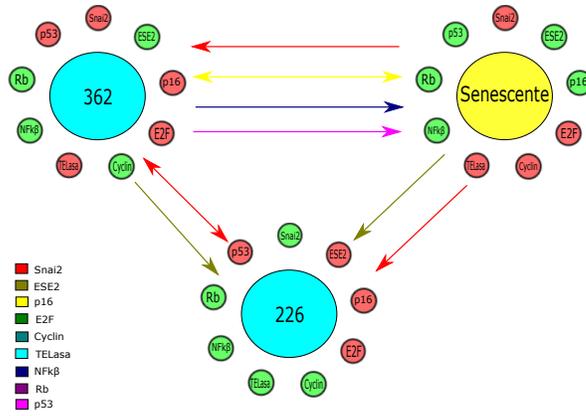
Trayectorias mutando $NFk\beta=1$.
Control ignorando la dinámica.

Figura A.14: Trayectorías posibles encendiendo $NFk\beta$.



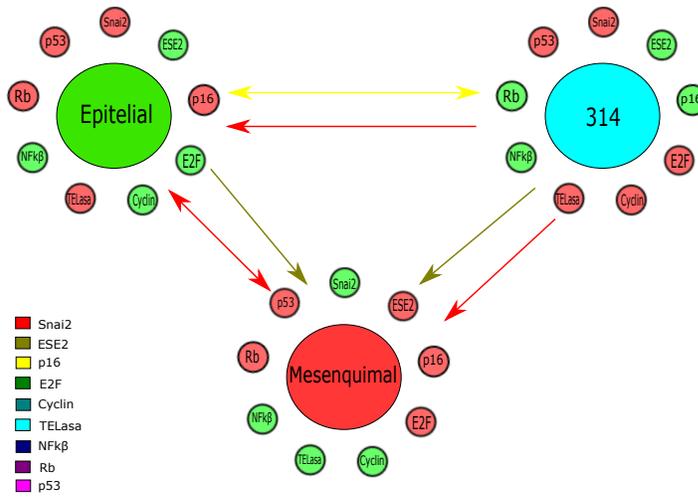
Trayectorias mutando $Rb=0$.
Control ignorando la dinámica.

Figura A.15: Trayectorías posibles apagando Rb .



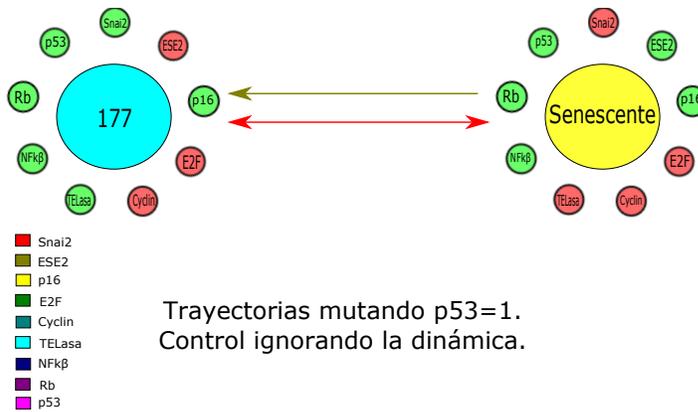
Trayectorias mutando Rb=1.
Control ignorando la dinámica.

Figura A.16: Trayectorías posibles encendiendo *Rb*.



Trayectorias mutando p53=0.
Control ignorando la dinámica.

Figura A.17: Trayectorías posibles apagando *p53*.



Trayectorias mutando p53=1.
Control ignorando la dinámica.

Figura A.18: Trayectorías posibles encendiendo *p53*.

A.2. Mutantes con control AND

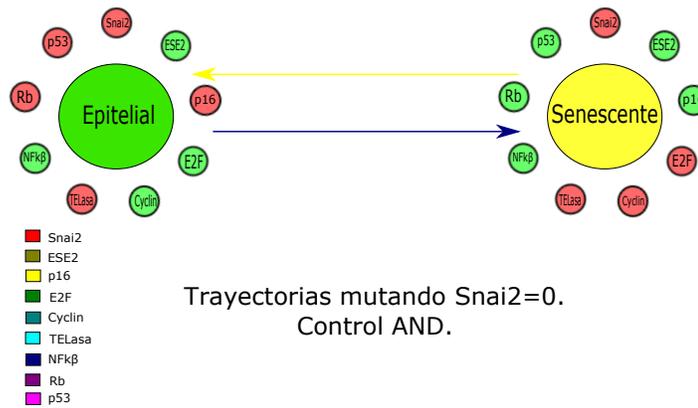


Figura A.19: Trayectorías posibles apagando *Snai2*.

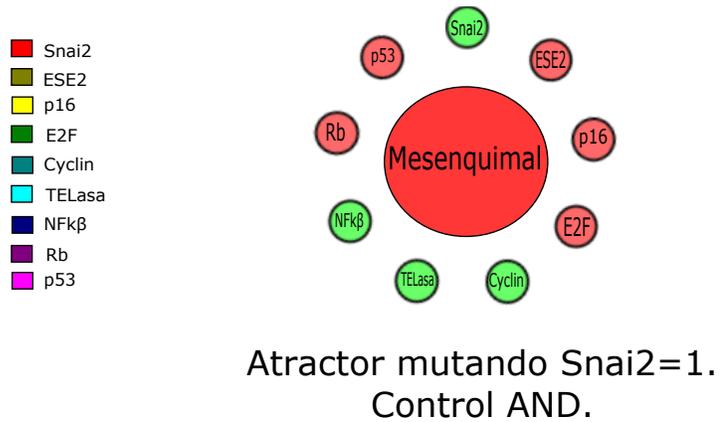
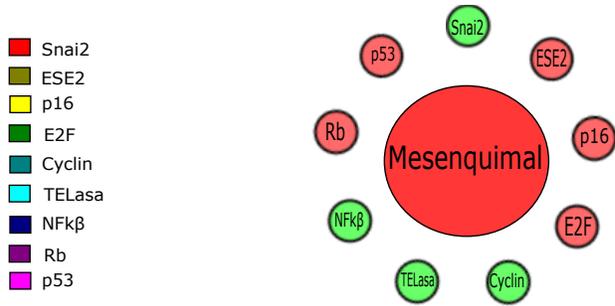
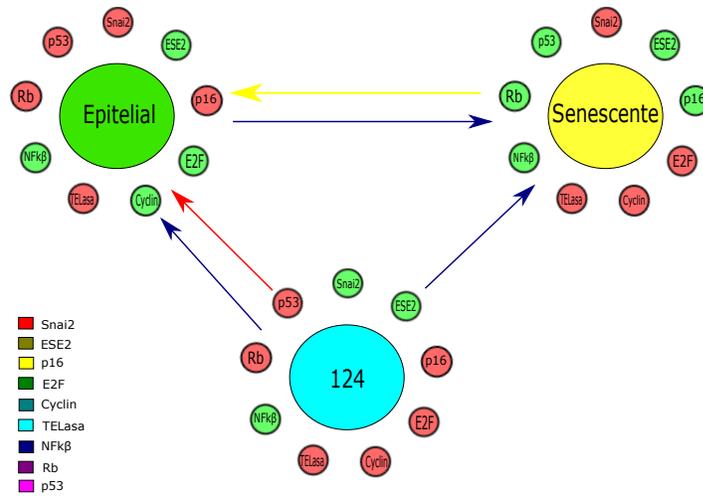


Figura A.20: Trayectorías posibles encendiendo *Snai2*.



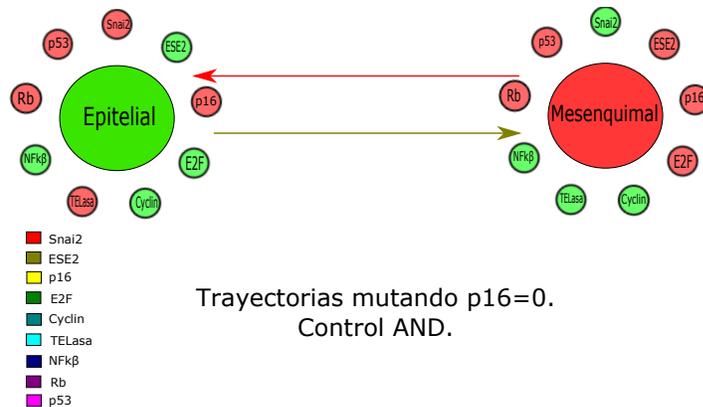
Atractor mutando $ESE2=0$.
Control AND.

Figura A.21: Trayectorías posibles apagando $ESE2$.



Trayectorias mutando $ESE2=1$.
Control AND.

Figura A.22: Trayectorías posibles encendiendo $ESE2$.



Trayectorias mutando $p16=0$.
Control AND.

Figura A.23: Trayectorías posibles apagando $p16$.

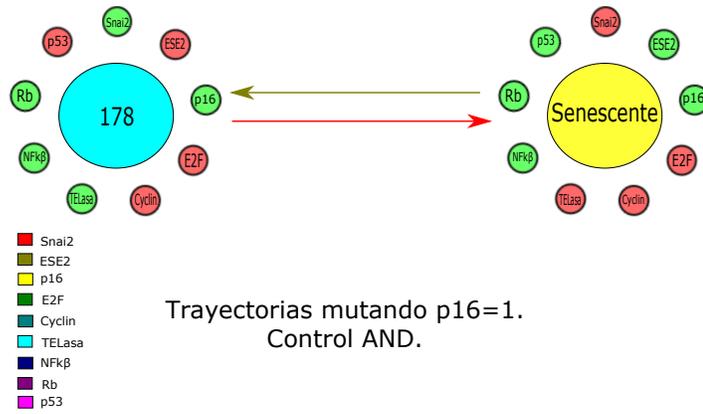


Figura A.24: Trayectorías posibles encendiendo $p16$.

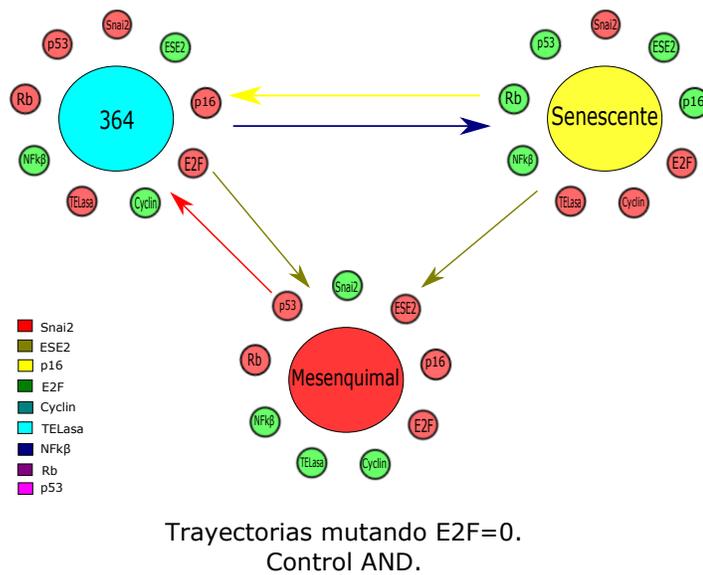


Figura A.25: Trayectorías posibles apagando $E2F$.

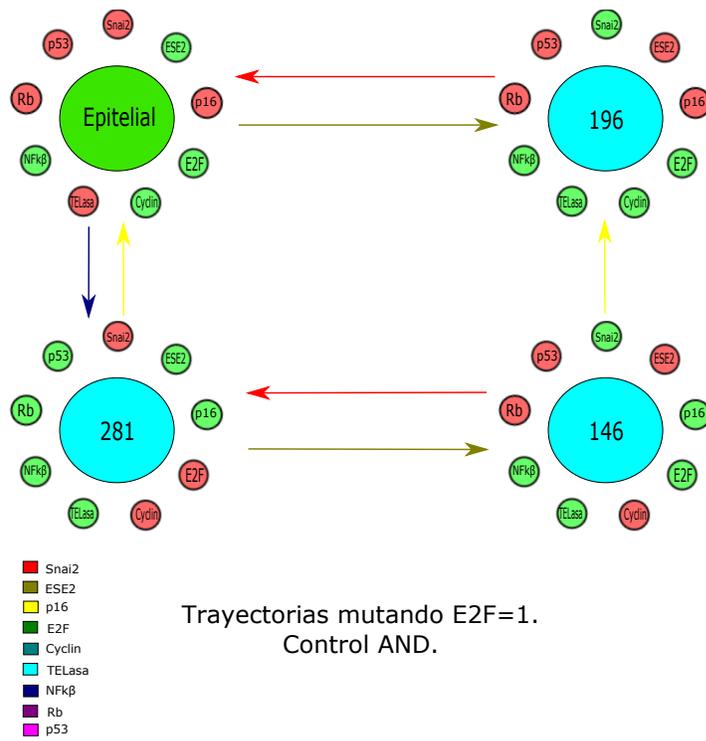


Figura A.26: Trayectorías posibles encendiendo $E2F$.

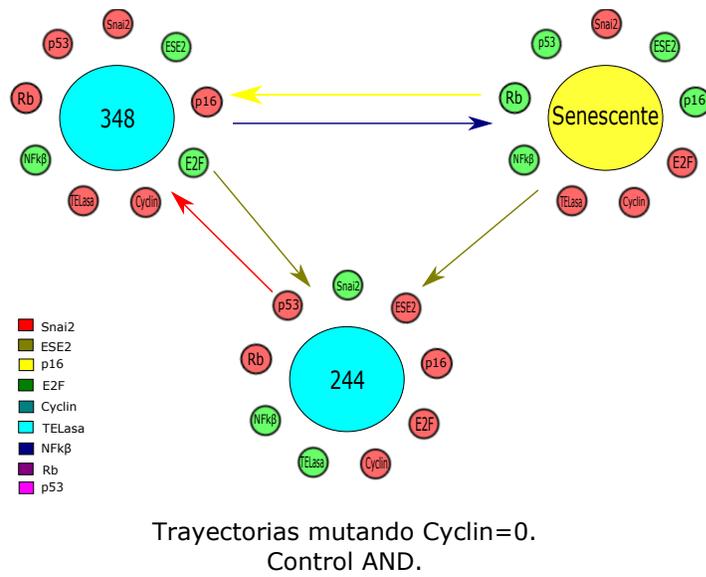
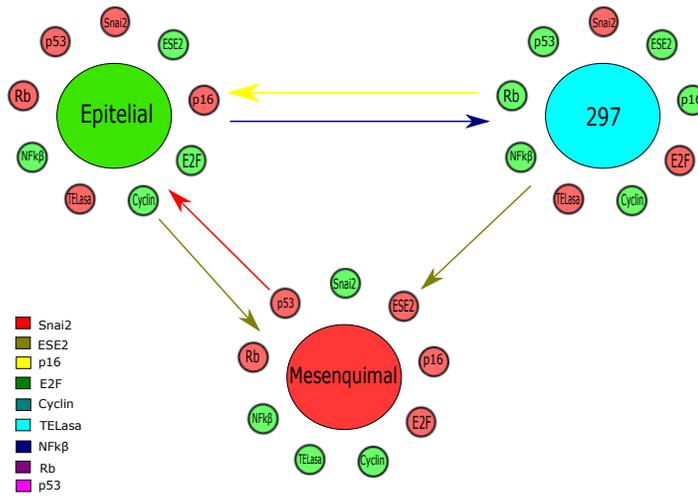
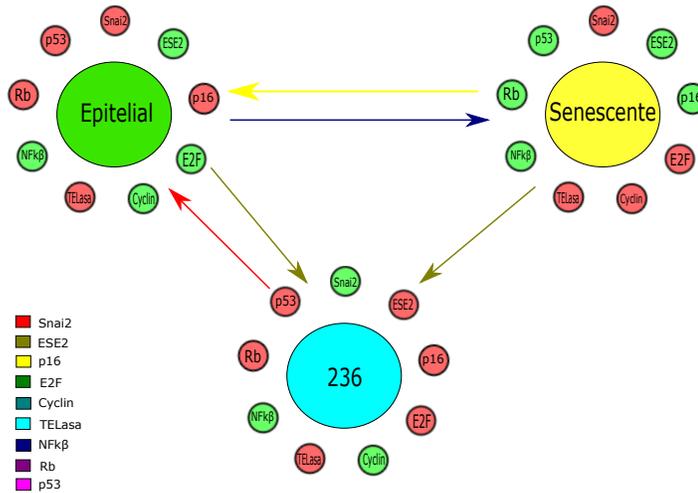


Figura A.27: Trayectorías posibles apagando $Cyclin$.



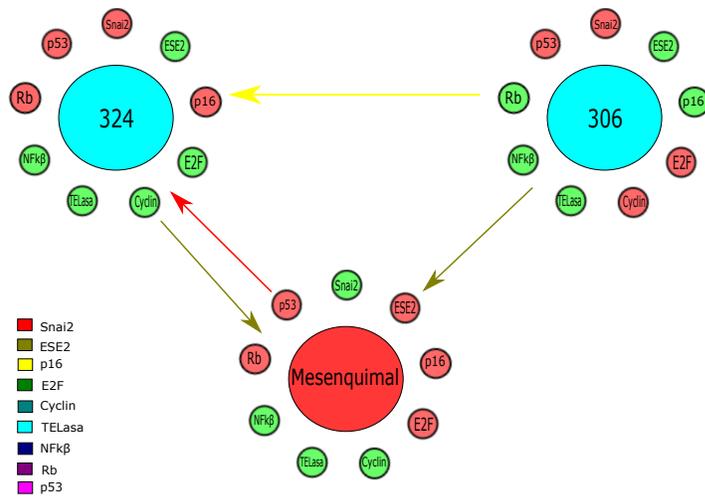
Trayectorias mutando Cyclin=1.
Control AND.

Figura A.28: Trayectorías posibles encendiendo *Cyclin*.



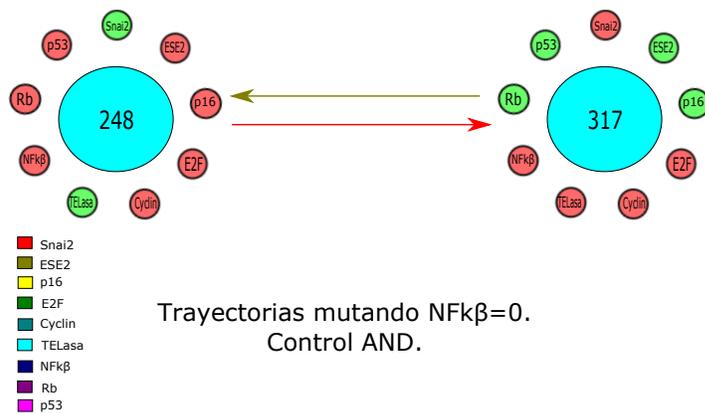
Trayectorias mutando TELasa=0.
Control AND.

Figura A.29: Trayectorías posibles apagando *TELasa*.



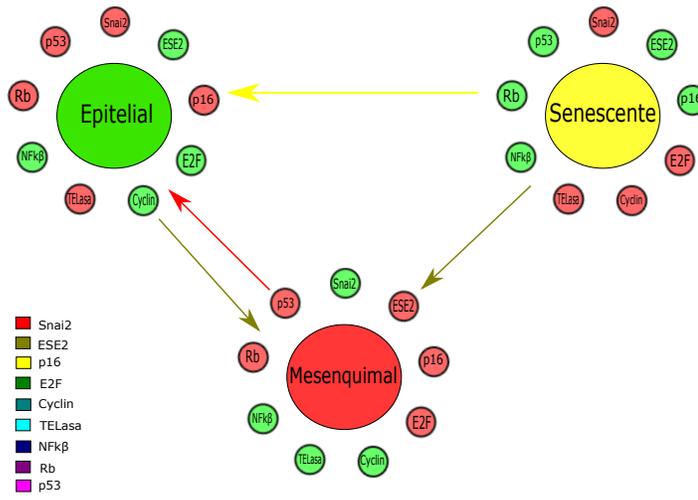
Trayectorias mutando $TELasa=1$.
Control AND.

Figura A.30: Trayectorías posibles encendiendo $TELasa$.



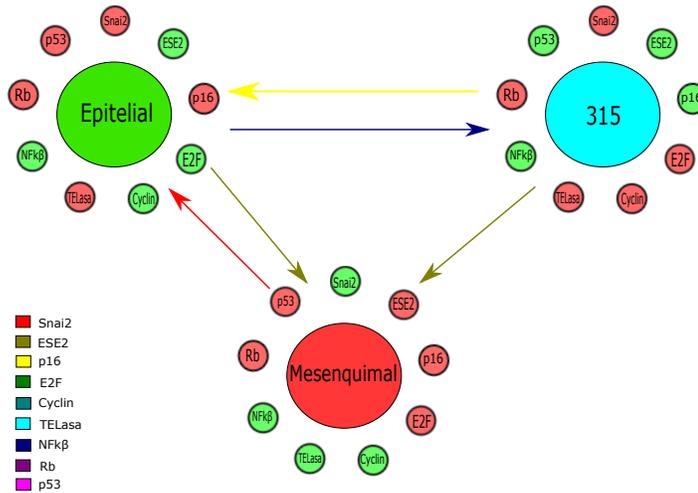
Trayectorias mutando $NFk\beta=0$.
Control AND.

Figura A.31: Trayectorías posibles apagando $NFk\beta$.



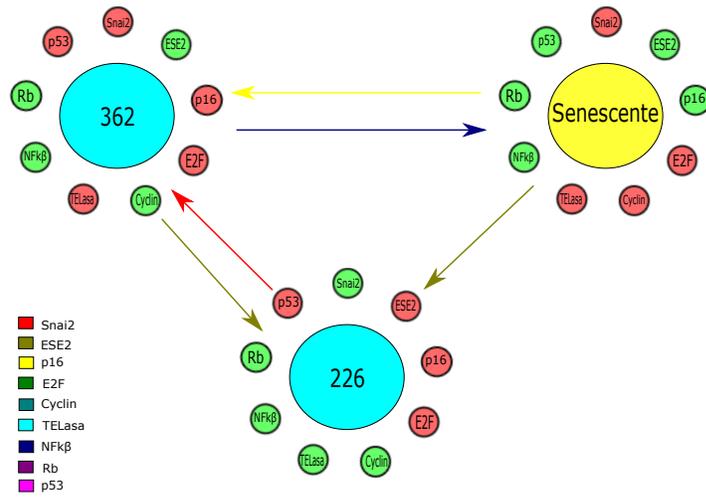
Trayectorias mutando $NFk\beta=1$.
Control AND.

Figura A.32: Trayectorías posibles encendiendo $NFk\beta$.



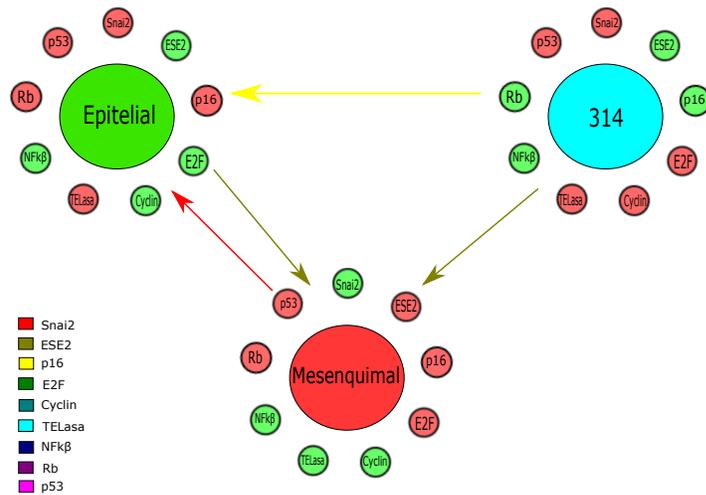
Trayectorias mutando $Rb=0$.
Control AND.

Figura A.33: Trayectorías posibles apagando Rb .



Trayectorias mutando Rb=1.
Control AND.

Figura A.34: Trayectorías posibles encendiendo *Rb*.



Trayectorias mutando p53=0.
Control AND.

Figura A.35: Trayectorías posibles apagando *p53*.

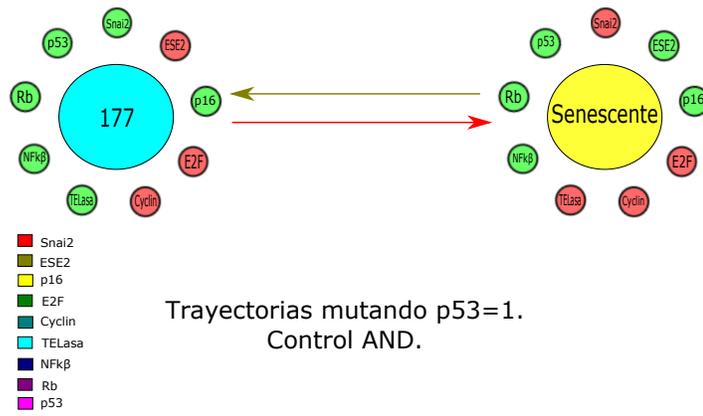


Figura A.36: Trayectorías posibles encendiendo *p53*.

Apéndice B

Códigos

```
1 %Codigo para calcular los atractores usando el toolbox de STP.
2 clear
3 clc
4 tic
5 k = 2; %Se define logica binaria
6 %Se definen algunas matrices
7 ME = lme(k); % equivalence
8 MI = lmi(k); % implicaiton
9 MD = lmd(k); % disjunction
10 MN = lmn(k); % negation
11 MR = lmr(k); % power-reducing matrix
12 MC = lmc(k); % conjunction
13 MU = lmu(k); % dummy matrix
14 MDC= sp(MD,MC); %Se definen para buscar compactar un poco la notacion.
15 MCN= sp(MC,MN);
16
17 %Se definen las ecuaciones con la siguiente nomenclatura
18 %a=Snai2, b=ESE2, c=p16, d=E2F, e= Cyclin, f=TELasa, g=NFkB, h=Rb, i=p53.
19 a= 'MD MN B MC A G';
20 b= ' MD MN A MC B MN G';
21 c = 'MD MC I MC MN A MN C MD MC I MC MN A MN F MD MC I MC MN C MN F MD MC I MC MN
    D MN F MD MC MN I MC C D MD MC A MC C MC D F MC MN A MC C MN D';
22 d = 'MC MN I MC MN A MN H';
23 e= ' MD MC MN A MN C MC MN B MC MN C G';
24 f= 'MN B';
25 g = 'MD A MD B MD C G';
26 h = 'MD I MC C E';
27 i = ' MD MC MN A MC C MN F MC MN A MC MN F MN G';
28 eqn = {a,b,c,d,e,f,g,h,i};
29
30 options = lmsset('vars',{ 'A', 'B', 'C', 'D', 'E', 'F', 'G', 'H', 'I' }); %Se definen las
    variables a usar
31
```

```

32 eqn = completeeqn(eqn, options); % completa las ecuaciones para involucren a todas
    las variables
33 expr = stdform(eqn, options, k); % obtiene la forma canonica para cada una de las
    variables
34
35 for i=1:length(expr) % calcula la matriz de estructura para cada
    variable
36     i
37     expr{i} = eval(expr{i});
38
39 end
40 ML2 = ctimes(expr{:}); % las multiplica para obtener la matriz de transicion
41
42
43 % Analiza dinamica
44 bn(ML2);
45 toc % devuelve el tiempo que tardo en realizar el calculo.

```

Código B.1: Código que calcula los atractores usando el *toolbox STP*.

```

1 # Encontrar atractores .
2 library ( BoolNet )
3 EMT <- loadNetwork ( "EMT.txt" )
4 # Obtener atractores sincronos de forma exhaustiva
5 attractors <- getAttractors ( EMT, method= "exhaustive" )
6 # graficar atractores
7 getBasinOfAttraction ( attractors , 2 )
8 plotAttractors ( attractors , mode="graph" )
9 plotNetworkWiring ( EMT )

```

Código B.2: Código que calcula los atractores usando R con Boolnet.

Bibliografía

- [1] Albino, D., Longoni, N., Curti, L., Mello-Grand, M., Pinton, S., Civenni, G., Thalmann, G., Ambrosio, G. D., Sarti, M., Sessa, F., Chiorino, G., Catapano, C. V., and Carbone, G. M. (2012). Ets3 ehf controls epithelial cell differentiation and its loss leads to prostate tumors with mesenchymal and stem-like features. *Cancer Research*, 72(11):2889–2900.
- [2] Chairez Veloz, José Eduardo (2014). Análisis de propiedades de controlabilidad en redes de regulación genética del desarrollo de organismos vivientes. Master’s thesis, CINVESTAV-IPN.
- [3] Chakrabarti, R., Hwang, J., Blanco, M. A., Wei, Y., Lukačičin, M., Romano, R.-A., Smalley, K., Liu, S., Yang, Q., Ibrahim, T., Mercatali, L., Amadori, D., Haffty, B. G., Sinha, S., and Kang, Y. (2012). Elf5 inhibits the epithelial–mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing snail2. *Nature Cell Biology*, 14(11):1212–1222.
- [4] Chaouiya, C., Naldi, A., and Thieffry, D. (2012). *Logical Modelling of Gene Regulatory Networks with GINsim.*, volume 804, pages 463–79.
- [5] Cheng, D. and Qi, H. (2009). Controllability and observability of boolean control networks. *Automatica*.
- [6] Cheng, D., Qi, H., and Li, Z. (2011). *Analysis and Control of Boolean Networks. A Semi-tensor Product Approach*. Communications and Control Engineering. Springer.
- [7] Cohen, W. W. (2007). *A Computer Scientist’s Guide to Cell Biology: A Travelogue from a Stranger in a Strange Land*. Springer.
- [8] Hanrahan, K., O’Neill, A., Prencipe, M., Bugler, J., Murphy, L., Fabre, A., Pühr, M., Culig, Z., Murphy, K., and Watson, R. W. (2017). The role of epithelial-mesenchymal transition drivers ZEB1 and ZEB2 in mediating docetaxel-resistant prostate cancer. *Molecular Oncology*, 11(3):251–265.
- [9] Jacob, F. and Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3(3):318 – 356.

- [10] Kauffman, S. (1969). Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic. *Journal of Theoretical Biology*, 22:437,467.
- [11] Li, K., Guo, Y., Yang, X., Zhang, Z., Zhang, C., and Xu, Y. (2017). ELF5-mediated AR activation regulates prostate cancer progression. *Scientific Reports*, 7(1).
- [12] Méndez-López, L. F., Davila-Velderrain, J., Domínguez-Hüttinger, E., Enríquez-Olguín, C., Martínez-García, J. C., and Alvarez-Buylla, E. R. (2017). Gene regulatory network underlying the immortalization of epithelial cells. *BMC Systems Biology*, 11(1):24.
- [13] Müssel, C., Hopfensitz, M., and Kestler, H. A. (2010). BoolNet – an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics*, 26(10):1378–1380.
- [14] R Core Team (2013). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- [15] Sharan, R. (2007). Analysis of Biological Networks: Transcriptional Networks - Promoter Sequence Analysis, lecture notes. Escribas: Shalu Karni and Yifat Felder.
- [16] Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Stein, T. I., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M., and Lancet, D. (2016). The genecards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*, 54(1):1.30.1–1.30.33.
- [17] Takaishi, M., Tarutani, M., Takeda, J., and Sano, S. (2016). Mesenchymal to epithelial transition induced by reprogramming factors attenuates the malignancy of cancer cells. *PLOS ONE*, 11(6):e0156904.
- [18] Wang, T., Zheng, L., Wang, Q., and Hu, Y.-W. (2018). Emerging roles and mechanisms of FOXC2 in cancer. *Clinica Chimica Acta*, 479:84–93.
- [19] WHO (2018). Nota informativa: cancer. Web: <http://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/cancer>.
- [20] Wu, B., Cao, X., Liang, X., Zhang, X., Zhang, W., Sun, G., and Wang, D. (2015). Epigenetic regulation of elf5 is associated with epithelial-mesenchymal transition in urothelial cancer. *PLOS ONE*, 10(1):e0117510.
- [21] Yang, H. and Yan, H. (2018). Expression of ELF5 in endometrial carcinoma tissues and its clinical significance. *Oncology Letters*.
- [22] Yang, J. and Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: At the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental Cell*, 14(6):818–829.

- [23] Yeung, T.-L., Leung, C. S., Wong, K.-K., Gutierrez-Hartmann, A., Kwong, J., Gershenson, D. M., and Mok, S. C. (2017). ELF3 is a negative regulator of epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Oncotarget*, 8(10).